

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

*Bureau canadien  
des brevets  
Certification*

*Canadian Patent  
Office  
Certification*

La présente atteste que les documents  
ci-joints, dont la liste figure ci-dessous,  
sont des copies authentiques des docu-  
ments déposés au Bureau des brevets.

This is to certify that the documents  
attached hereto and identified below are  
true copies of the documents on file in  
the Patent Office.

Mémoire descriptif et dessins, de la demande de brevet no: 2,346,968, tels que déposés, le  
23 mai 2001, par **INSTITUT PASTEUR**, cessionnaire de Pierre Druilhe et Anne-  
Charlotte Gruner, ayant pour titre: "Antigènes de Plasmodium Falciparum et Leurs  
Applications Vaccinales et Diagnostiques"

  
Agent certificateur/Certifying Officer

28 mai 2004

Date

## ANTIGÈNES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

### CONTEXTE DE L'INVENTION

#### 5 a) Domaine de l'invention

La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des  
10 méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme.

#### b) Brève description de l'art antérieur

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis  
15 par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Malgré le fait que l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA, il n'existe pas encore de vaccin efficace contre cette maladie.

Des études précédentes ont conduit à la mise en évidence de polypeptides  
20 antigéniques du stade pré-érythrocytaire de la maladie, notamment les polypeptides SALSA (pour Sporozoïte Liver Stage Antigen) décrits dans EP A-0407230, le LSA 1 (pour Liver Stage Antigen) décrit dans WO 92/13884 et LSA-3 décrit dans FR 2,735,478.

La présente invention est relative à de nouvelles molécules  
25 polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques des stades pré-érythrocytaires et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie.

### RÉSUMÉ DE L'INVENTION

30 La Demanderesse a identifié une série de 120 fragments d'ADN génomique codant pour des protéines exprimées aux stades pré-érythrocytaires, c'est-à-dire au stade sporozoïte et/ou au stade hépatique. La caractérisation

initiale de cette série de clones a conduit à identifier l'antigène LSA-1, puis SALSA, puis STARP, puis LSA-3. Des travaux plus récents portant sur 10 fragments de la même banque de clones codant pour des stades pré-érythrocytaires a permis de fournir des précisions concernant 8 d'entre eux, 3 se  
5 sont avérés être des gènes déjà connus comme étant exprimés au stade érythrocytaire et les 5 autres comme des gènes nouveaux non décrits à ce jour, et dont l'expression aux stades pré-érythrocytaires a pu être confirmée.

Par ailleurs, les travaux réalisés en utilisant les cellules de volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, celles de chimpanzés protégés par la même  
10 méthode et celles de chimpanzés comme d'*Aotus trivirgatus*, protégés par immunisation par l'antigène LSA-3 ont conduit à caractériser les réponses cellulaires à fort taux de sécrétion d'interféron- $\gamma$ , généralement associés avec une faible production d'anticorps, comme étant associées avec l'état de protection, et vice-versa.

15 Parmi les nouveaux gènes pré-érythrocytaires étudiés, deux d'entre eux, dénommés DG747 et DG772 possèdent plusieurs propriétés remarquables : ils génèrent des réponses cellulaires à taux élevé d'Interféron- $\gamma$ , détectées par ELISPOT chez des volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, qui sont retrouvés également pour plusieurs régions de l'antigène LSA-3 mais qui sont  
20 absentes pour 4 régions de l'antigène LSA-1, deux de SALSA, deux de STARP et deux de la "CircumSporozoïte protein". Ces deux mêmes clones sont positifs également dans les mêmes tests chez les chimpanzés protégés par des sporozoïtes irradiés. Le profil de réponse différentielle entre les chimpanzés protégés et celles de chimpanzés ayant reçu des sporozoïtes irradiés à trop forte  
25 dose, et non protégés, est identique à celui enregistré avec la molécule LSA-3 qui est capable d'induire une protection. Ce profil de réponse correspond, d'après les travaux réalisés chez le rongeur, à la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. La séquence complète des deux gènes a été identifiée. Les protéines correspondantes ont une antigénicité élevée  
30 chez les individus exposés au parasite en zone d'endémie (réaction chez 80% des adultes de zone d'endémie). Leur localisation en surface du sporozoïte et leur production au cours de la maturation intra-hépatique du parasite a été

confirmée par diverses méthodes biologiques. Leur immunogénicité chez l'animal sous forme de protéines recombinantes, ou sous forme de plasmides (immunisation génétique) a été démontrée. Ces caractéristiques en font des candidats importants qui demandent à être l'objet d'études complémentaires, en particulier d'immunisation et de challenge chez le primate supérieur pour obtenir des formulations vaccinales nouvelles, seules ou associées à l'antigène LSA-3.

### BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

- 10 Les **Figures 1A, 1B, 1C et 1D** montre la liste des séquences nucléotidiques (SEQ ID NOs: 1 et 2) et en acides aminé (SEQ ID NOs: 3 et 4) de DG747 et DG772.
- La **Figure 1E** montre des séquences répétées dégénérés caractéristiques du clone DG747.
- 15 La **Figure 2A** montre la séquence du gène codant pour DG747.
- La **Figure 2B** montre la séquence du gène codant pour DG772.
- La **Figure 3.1** est une représentation schématique des protéines correspondantes au DG747 et DG772.
- La **Figure 3.2** montre des IFATs des stades sporozoïtes et sanguins de *P. falciparum* et des sporozoïtes de *P. yoelii* avec les anticorps anti-DG747 ou anti-DG772.
- 20 La **Figure 3.3** montre des Western blots de *P. falciparum*, *P. yoelii* et de *P. berghei* utilisant des anticorps anti-His<sub>6</sub>-747 (a) et anti-His<sub>6</sub>-772 (b).
- La **Figure 3.4** montre sous forme de photographies des résultats de PCR d'ADN de 12 souches différentes avec des amorces spécifiques de DG747 (a) et DG772 (b).
- 25 La **Figure 3.5** illustre à l'aide de graphiques la prévalence des réponses humorales contre His<sub>6</sub>-747 (a) et His<sub>6</sub>-772 (b) dans deux groupes d'âge et dans deux zones d'endémie différente.
- 30 La **Figure 3.6** illustre à l'aide de graphiques les réponses cellulaires contre His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 chez des humains et des chimpanzés immunisés avec des sporozoïtes irradiés.

La **Figure 3.7** illustre à l'aide de graphiques la distribution des isotypes d'IgG dans les réponses humorales contre His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 d'individus exposés différenciellement au paludisme.

La **Figure 3.8** illustre à l'aide de graphiques les réponses humorales de souris immunisées avec quatre formulations de protéines recombinantes.

### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

L'originalité de la présente invention porte sur la mise en évidence de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire du paludisme et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostic de la maladie.

Plus particulièrement, l'invention vise des polynucléotides ayant une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides consécutifs et ayant au moins 60%, préférablement 80% et plus préférablement au moins 95% d'identité avec la SEQ. ID NO: 1 ou NO 2. D'autres molécules selon l'invention contiennent au moins 20 nucléotides consécutifs ou au moins 50. D'autres molécules selon l'invention s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec les séquences nucléotidiques ci-dessus, et plus particulièrement avec les SEQ. ID NOs: 1 et/ou NO 2. À titre d'exemple non-limitatif de conditions de fortes stringences l'on retrouve la méthode suivante:

- a) pré-hybridation et hybridation à 68°C dans une solution contenant: 5X SSPE (1X SSPE = 0.18 M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 5X solution de Denhardt; 0.05% (w/v) dodecyl sulfate de sodium (SDS); et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon;
- b) deux lavages à température ambiante pendant 10 min en présence de 2X SSPE et de 0.1% SDS;
- c) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 1X SSPE et 0.1% SDS; et
- d) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 0.1X SSPE et 0.1% SDS.

L'invention vise aussi les polypeptides (et les fragments de ceux-ci) qui dérivent des séquences nucléotidiques ci-dessus mentionnés et préférablement

les polypeptides ayant au moins 10 acide aminés consécutifs et au moins 80% et plus préférentiellement au moins 95% d'homologie avec l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 7, et la SEQ ID NO: 8. D'autres molécules selon l'invention contiennent au moins 20 acides aminés consécutifs ou au moins 50.

Il est bien connu dans le domaine comment déterminer le pourcentage d'identité entre différentes séquences. À titre d'exemple, une méthode d'analyse d'alignement de séquences nucléotidiques et peptidiques selon l'invention est avantageusement le programme GAP GCG™ (Genetic Computer Group) du manuel de programmation UNIX™ (Wisconsin Sequence Analysis Package™), algorithme de Needleman et Wunsch. Les paramètres utilisés sont les paramètres par défaut ou les paramètres suivants: pour une comparaison de séquences de nucléotides: "gap penalty" = 50; "gap extension penalty": 3; et pour une comparaison de séquences d'acides aminés: "gap penalty" = 5; "gap extension penalty": 0.30.

Les peptides selon la présente invention peuvent être préparés par tout procédé approprié. Ils peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique mais il est également possible de les obtenir par voie biologique en utilisant notamment différents vecteurs dans les cultures cellulaires appropriées tel que cela sera décrit ci-après.

Les molécules de l'invention peuvent être utilisées telles quelles ou être modifiées (conjugués chimiques, protéine de fusion) si nécessaire. Par exemple, on peut envisager des modifications (chimiques ou nucléotidiques ou peptidiques) permettant aux nucléotides/peptides de franchir certaines barrières biologiques, de montrer une meilleure solubilisation, de faciliter leur incorporation dans des formes galéniques particulières comme par exemple des liposomes ou des microparticules. Il convient d'ailleurs de remarquer à ce propos que les peptides selon la présente invention peuvent se présenter sous forme déglycosylée, ou glycosylée, si cela est nécessaire. Une personne versée dans le domaine de l'invention saura obtenir différents polynucléotides/polypeptides et elle saura également déterminer quels sont, parmi les

polynucléotides/polypeptides obtenus, ceux qui ont une activité biologique adéquate.

Ainsi, l'invention a aussi pour objet un procédé de préparation d'un peptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression (plasmide, cosmide, virus, etc) comprenant les séquences d'ADN  
5 d'expression pour les peptides de l'invention, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du peptide dans le milieu de culture.

L'invention concerne donc également tout vecteur (de clonage et/ou  
10 d'expression) et tout hôte cellulaire (procaryote ou eucaryote) transformé par un tel vecteur, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence de nucléotides codant pour un peptide selon l'invention.

Plus particulièrement, l'invention vise les cellules *E. Coli* recombinante contenant un insert correspondant aux polynucléotides définis par les SEQ ID  
15 NOs: 1 et 2. Plus préférablement les cellules *E. Coli* sont celles qui ont été déposée à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accèsion I-2671 et I-2672. Brièvement, ces cellules ont été obtenues par transformation d'un plasmide contenant soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la SEQ ID NO: 1, soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la  
20 SEQ ID NO:2. dans la souche *E. Coli* Dh5 $\alpha$ . Chacun des plasmides a été obtenus à partir d'un phage  $\lambda$ gt11 recombinant contenant l'insert. Une PCR a été effectuée avec des amorces flanquantes à l'insert et cet insert amplifié a été digéré avec EcoR1 et sous-cloné dans le vecteur pTreHis<sub>6</sub> (Invitrogen) dans les sites de EcoR1.

25 L'utilisation de vecteurs pour l'expression de protéines et de peptides dans les cellules d'un hôte, notamment l'humain, est connue et ne sera pas décrite plus en détail. Il peut être avantageux d'utiliser des vecteurs incorporant des séquences capables d'augmenter l'immunogénicité des polynucléotides/polypeptides de la présente invention, telles que les séquences  
30 CPG, le gène du GMCSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou des gènes des cytokines. Les constructions spécifiques dépendent évidemment de l'hôte, de l'épitope et du vecteur retenu.



Les peptides de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent aussi être utilisés pour préparer des anticorps polyclonal ou monoclonal capables de se fixer (préférentiellement de manière spécifique) sur au moins un peptide/polynucléotide objet de l'invention. La présente invention vise donc également de tels anticorps purifiés qui peuvent être obtenus par des techniques très bien connues comme par exemple la technique décrite par Kolher et Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* (1975), 262:495-497)

Dans un mode de réalisation privilégié de l'invention, au moins une portion des peptides immunogéniques/polynucléotides selon l'invention est conjuguée à un support sur lequel elle est absorbée ou fixée de façon covalente ou non-covalente à son extrémité C et/ou N-terminale. Le support peut être constitué de molécules porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques. Ces molécules porteuses peuvent permettre notamment d'augmenter l'immunogénicité des peptides de l'invention par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. À titre d'exemple de molécules porteuses, on mentionnera des protéines naturelles telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocyanines, le PPD (purified protein derivative) de la tuberculine, etc. À titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine). À titre de supports hydrocarbonés ou lipidiques, on mentionnera les acides gras saturés ou insaturés. Le support peut également prendre la forme de liposomes, de particules et microparticules, de vésicules, de microsphères de billes de latex, polyphosphoglycans (PGLA), ou de polystyrène.

L'invention porte aussi sur des compositions vaccinales/thérapeutiques (médicament) comprenant des peptides/polynucléotides, des conjugués et/ou des anticorps polyclonaux ou monoclonaux tel que décrits précédemment, et un véhicule pharmaceutique acceptable. L'invention se rapporte aussi à des compositions immunogènes capables d'induire une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodiums*, aussi bien *in vivo* que *in vitro* et, de façon préférée, un protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*.

Préféablement, les compositions selon l'invention permettent la production d'interféron- $\gamma$  par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés et/ou l'obtention d'une réponse humorale IgG de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

5 Ces compositions peuvent être avantageuses dans le but d'être administrés *in vivo* pour le traitement ou la prévention du paludisme chez l'humain. Bien entendu, l'utilisation de compositions à base d'anticorps nécessite généralement que ceux-ci soient compatibles avec l'administration à l'être humain. Il peut notamment s'agir d'anticorps humanisés par des techniques  
10 connues ou directement exprimés *in situ* à partir de la séquence d'ADN comme par exemple la technique décrite dans Ren EC, Cellular and Molecular approaches to developing human monoclonal antibodies as drugs (1991), *Ann. Acad. Med. Singapore*, 20:66-70.

Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous  
15 une forme solide ou liquide quelconque habituelle pour l'administration pharmaceutique, c'est-à-dire par exemple des formes d'administration liquide, en gel, ou tout autre support permettant par exemple la libération contrôlée. Parmi les compositions utilisables, on peut citer notamment les compositions injectables plus particulièrement destinées aux injections dans la circulation sanguine chez  
20 l'humain.

Les compositions de l'invention peuvent comporter également des composants augmentant ou susceptible d'augmenter l'immunogénicité des peptides, notamment d'autres peptides immunogènes, des adjuvants d'immunité spécifiques ou non tels que l'alun, le QS21, l'adjuvant de Freund, l'adjuvant SBA<sub>2</sub>,  
25 la montanide, des polysaccharides ou des composés équivalents.

La présente invention concerne de plus des compositions destinées à être administrées afin d'exprimer *in situ* les peptides décrits précédemment. Par exemple, en injectant l' "ADN nu" codant pour les peptides immunogéniques de l'invention, cette injection conduit, dans un certain nombre de cas, à l'expression  
30 du peptide codée et à une réponse immunitaire contre ledit peptide. On pourra également utiliser des systèmes d'ADN nu mais comportant leur propre système d'expression ou des vecteurs d'expression tel que décrit précédemment. Les

vecteurs d'expression sont susceptibles, dans certains cas, d'améliorer l'activité des peptides exprimés. Les systèmes de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont connus et sont déjà largement décrits dans la littérature. Des exemples de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont  
5 décrits dans la demande internationale WO 95/111307 et dans la publication de Bot *et al.* (DNA immunization of newborn mice with a plasmid expressing nucleoprotein of *Influenza* virus (1996), *Viral Immunol.*, 9:207-210)

L'invention porte aussi sur des méthodes de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum*.

10 Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode comprend les étapes suivantes:

- a) mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un  
15 anticorps tel que décrit précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns; et
- b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode diagnostique comprend les étapes suivantes:

- 20 a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec des molécules polynucléotidiques/polypeptidiques telles que décrites précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns  
25 impliquant au moins une desdites molécules et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et
- b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

L'invention a aussi pour objet des kits (trousses) pour le diagnostic du paludisme chez un individu. Selon un mode de réalisation de l'invention, le kit  
30 comprend les éléments suivants:

- a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les molécules polynucléotidiques; les molécules polypeptidiques et les conjugués tels que décrits précédemment;
- b) des réactifs pour la constitution du milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des molécules définies en a); et
- c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le kit comprend les éléments suivants:

- des anticorps tels que décrits précédemment;
- des réactifs pour la constitution du milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué

Bien qu'à travers le mémoire descriptif de la présente invention on utilise le terme "peptide" et "polypeptide", il est entendu que l'invention ne se limite pas aux composés formés par l'union d'un nombre limité d'acides aminés. En effet, la souplesse des technologies recombinantes permet de réaliser des protéines comportant une pluralité d'épitopes identiques ou différents et susceptibles d'améliorer l'activité immunogénique du produit final. Ainsi la présente invention couvre également les polymères immunogéniques comprenant entre deux et dix peptides choisis parmi les polypeptides définis précédemment. De même, la présente invention inclut les oligonucléotides ayant une séquence nucléotidique codant pour des oligonucléotides incorporant un ou plusieurs polynucléotides tels que définis précédemment.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

## EXEMPLES

Les exemples qui suivent servent à illustrer l'étendue d'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectués sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puissent utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

### 10 1) INTRODUCTION

#### 1.1 Historique du paludisme

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Les efforts soutenus et le programme d'éradication entamé dans les années 50, financé par l'OMS ont permis de limiter les zones où la maladie se propageait et de diminuer le nombre de personnes infectées. Depuis, la baisse d'efficacité des moyens de lutte contre le parasite a provoqué une augmentation des cas de paludisme par rapport à il y a 20 ans. Aujourd'hui le paludisme demeure concentré dans la ceinture subtropicale où entre 300 et 500 millions de cas cliniques sont recensés annuellement, dont au minimum 3 millions succombent en majorité à cause de l'infection par le *P. falciparum*. Suite à l'apparition et à l'extension d'une résistance globale aux seuls médicaments efficaces, et parce que les régions affectées sont en extension, l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA.

La description de l'infection paludéenne, dont les signes cliniques sont très caractéristiques, peut être retrouvée dans des écrits des civilisations les plus anciennes, tels que le *Nei Ching*, grand répertoire médical pour l'empereur chinois Huang Ti (2700 av. J. C.), des tablettes Mésopotamiennes (2000 av. J. C.), des papyrus Égyptiens (1500 av. J. C.) et des écrits Védiques (1500-800 av. J. C.). Une partie du « livre des épidémies » d'Hippocrate (460-370 av. J. C.) a

été consacrée à la description détaillée de fièvres tertiaires ou quaternaires où est mentionnée aussi une relation entre des splénomégalias et la proximité des zones marécageuses. D'ailleurs, le terme paludisme désigne une fièvre issue des zones marécageuses (L. palude = marécage), ce qui est aussi reflété par le  
 5 terme de malaria (l. mall'aria) probablement introduit par Sansovino en 1560 pour décrire le « mauvais air » issu des marécages. Le drainage de ces zones a été un des seuls moyens de contrôle du paludisme connu avant la découverte de l'agent infectieux. Malgré la connaissance des signes cliniques, le parasite causant la maladie n'a été découvert qu'à la fin du 19<sup>e</sup> siècle.

10 En 1880 Charles Louis Alphonse Laveran a observé l'exflagellation de microgamètes et des hématies altérées dans le sang de (Laveran, 1880), et il a associé ces formes avec la maladie. Ses conclusions ont été controversées et ne furent acceptées par d'autres, en particulier par l'importante école italienne, que 5 ans plus tard. Le mode de transmission de la maladie est resté inconnu encore  
 15 12 ans. Patrick Manson avait en 1877 démontré que le nématode de la filariose (Elephantiasis) était transmis par un moustique. Il était convaincu que le paludisme suivait un parcours semblable. Il a conseillé à Ronald Ross d'entamer des recherches à ce sujet et ce dernier a décrit en 1897, pour la première fois, des oocystes chez des moustiques ayant été nourris sur des humains infectés.  
 20 Puis, à l'aide de *Plasmodium* d'oiseaux, il a pu décrire le cycle entier du parasite chez le moustique. Ce cycle a été confirmé, en 1898, pour les espèces plasmodiales de l'homme par les chercheurs italiens menés par Battista Grassi.

On a longtemps cru qu'après inoculation par le moustique, le sporozoïte envahissait directement le globule rouge du mammifère hôte, initiant ainsi le  
 25 cycle sanguin asexué et sexué. Un cycle exo-érythrocytaire fut décrit dès 1908 chez des plasmodies d'oiseaux par H. de Beaufaire Aragao qui démontra le développement de formes atypiques, dans des cellules endothéliales et des macrophages, capables de libérer des formes envahissant les globules rouges et de se transformer en formes typiques pigmentées du parasite. Toutefois on a cru  
 30 que le cycle tissulaire était une forme particulière de ces espèces plasmodiales. Ce n'est qu'en raison des observations faites au cours d'infections paludéennes induites et suivies étroitement chez des individus (comme la malariothérapie des

années 1920-50) que la présence d'un stade supplémentaire tissulaire a été postulée puis activement recherchée. Les formes pré-érythrocytaires des parasites de primates et d'humains n'ont été découvertes qu'en 1948 lorsque H.E. Shortt et P. C. C. Garnham ont décrit des formes hépatiques issues d'inoculations de sporozoïtes de *P. cynomolgi* (proche de *P. vivax*) chez le singe rhésus (Shortt and Garnham, 1948). En 1951, les mêmes stades ont été décrits pour *P. falciparum* (Shortt et al., 1951) dans une expérience remarquable où une biopsie de foie a été prélevée chez un volontaire préalablement inoculé avec des millions de sporozoïtes. Toutefois les recrudescences dues à *P. vivax* ou à *P. ovale* n'étaient pas expliquées, et on a émis l'hypothèse d'un cycle exo-érythrocytaire « secondaire ». Ce n'est que beaucoup plus tard que ce phénomène fut démontré expérimentalement. Ainsi, un stade « dormant » de la forme hépatique, l'hypnozoïte, a été décrit en 1980 (Krotoski et al., 1980) pour *P. cynomolgi*, l'équivalent pour le primate de *P. vivax*. Cette forme est responsable des rechutes après une longue période d'absence de parasite dans le sang/d'exposition aux parasites, qui sont caractéristiques de *P. vivax* et *P. ovale*. Récemment, un stade supplémentaire, le mérophore, une forme provenant des formes sanguines, a été observé dans la rate et les ganglions lymphatiques de souris infectées par les *Plasmodium* murins (*P. yoelii*, *P. chabaudi* et *P. vinckei*) (Landau et al., 1999). Cette étape du cycle reste encore à être décrite dans les espèces plasmodiales humaines.

Le cycle du parasite, comme il est conçu aujourd'hui est représenté dans la figure 1 (Les parties entre parenthèse sont des formes décrites pour d'autres espèces de *Plasmodium*, mais pas pour *P. falciparum*).

## 1.2 Les moyens de lutte contre l'extension du paludisme : nécessité du développement d'un vaccin

Les deux découvertes de l'agent causal de la maladie et du vecteur de la maladie ont permis dès le début du 20<sup>e</sup> siècle d'élaborer des moyens de défense rationnels contre le paludisme en attaquant le parasite chez l'hôte vertébré par des médicaments ou en ciblant le moustique vecteur soit avec des larvicides, soit avec des insecticides, soit par l'utilisation de moustiquaires. Le succès de

l'élimination de la maladie dans les zones tempérées après la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale, a mené vers une mise en place d'un programme d'éradication du paludisme qui a culminé dans les années 60 où le DDT a été le principal outil contre les moustiques et la chloroquine a été la principale drogue contre le parasite. La taille des territoires endémiques ciblés a ainsi été réduite (quasi éradication dans les zones tempérées) et le nombre de personnes affectées par la maladie a initialement diminué. Cependant les succès dans les zones tropicales furent de courte durée. Le nombre de malades n'a pas cessé de croître d'une part à cause de l'augmentation démographique, d'autre part en raison de l'apparition de résistances aux insecticides et aux drogues disponibles.

L'apparition de ces résistances a nécessité de s'orienter vers d'autres moyens de lutte. L'existence d'une immunité naturelle induite par l'exposition aux parasites et l'observation que le transfert passif d'immunoglobulines de personnes immunes diminue la parasitémie ainsi que l'immunisation efficace et stérilisante par des sporozoïtes atténués par irradiation ont rendu raisonnable l'argument d'un vaccin contre le paludisme, dont le développement constitue alors une priorité de santé publique au niveau mondial.

### 1.3 A la recherche de l'immunité salvatrice

L'immunité naturelle contre le paludisme est caractérisée par un développement très lent et le fait qu'elle n'aboutit pas à une protection stérilisante. Dans les zones hyperendémiques, l'acquisition de l'immunité naturelle contre les stades érythrocytaires se manifeste chez les enfants d'abord par une tolérance au parasite (immunité anti-toxique) puis avec l'âge par une diminution de la charge parasitaire dans le sang (immunité anti-parasitaire).

Ces observations, faites au cours des études épidémiologiques ont été confirmées par des infections expérimentales. La malarariothérapie appliquée aux personnes atteintes de neurosyphilis (Boyd and Coggeshall, 1938; Ciuca et al., 1943; James, 1936), a permis de définir des paramètres qui interviennent dans l'acquisition de l'immunité dans des expériences étroitement contrôlées. Il a ainsi été montré que l'immunité acquise était d'une part dépendante de l'espèce et de la souche et d'autre part différait en fonction du stade du cycle parasitaire



infectant. Jusqu'à présent, les mécanismes précis de l'immunité anti-paludéenne restent à élucider.

5 Du fait que les signes cliniques et la transmission sont uniquement dus aux stades sanguins et que ceux-ci sont les plus accessibles aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la plupart des études vaccinales ont concerné ces stades. Une trentaine d'antigènes exprimés dans les parasites érythrocytaires ont été identifiés, particulièrement par des anticorps monoclonaux et considérés en tant que candidats vaccins. Toutefois les essais d'induction d'immunité protectrice par les rares antigènes testés chez l'homme sont demeurés infructueux jusqu'à  
10 présent.

La première immunisation avec les stades pré-érythrocytaires a été tentée sans succès par les frères Sergent en Algérie (Sergent and Sergent, 1910). La capacité de protéger de façon stérilisante (absence de toute parasitémie sanguine) n'a été obtenue que par l'immunisation avec des sporozoïtes atténués  
15 par irradiation. Cette approche fut initiée par des études chez l'oiseau avec des sporozoïtes irradiés par des rayons U.V. (Mulligan et al., 1941), et a été reprise 20 ans plus tard avec des plasmodies de rongeur en utilisant des sporozoïtes irradiés par des rayons X et plus tard des rayons  $\gamma$ , dont la dose peut être contrôlée plus facilement (Nussenzweig et al., 1967; Richards, 1966) ; l'immunité  
20 peut être maintenue par un rappel de sporozoïtes non-atténués (Orjih et al., 1982). Chez l'homme, une telle protection a aussi été obtenue (Clyde, 1975; McCarthy and Clyde, 1977), toutefois elle n'est induite qu'après un très grand nombre d'inoculations par des sporozoïtes irradiés si bien qu'une telle procédure vaccinale ne peut être appliquée à grande échelle.

25 Pendant longtemps, on a cru que la protection était corrélée avec un phénomène observé lorsque l'on incube les sporozoïtes avec du sérum immun, la CS (Circum sporozoïte) précipitation (Vanderberg et al., 1969). La protéine majoritaire reconnue par ce sérum, la protéine CS, a donc été considérée responsable de cette immunité. Depuis elle a été à l'origine de multiples études  
30 vaccinales dans beaucoup de modèles expérimentaux. Or jusqu'à présent aucune de ces études n'a pu reproduire une immunité aussi solide que celle induite par des sporozoïtes irradiés.

Une évaluation critique des résultats expérimentaux précédents a mené à postuler que c'était le stade hépatique et non le sporozoïte qui était à l'origine de l'immunité stérilisante (Druilhe and Marchand, 1989). L'indice principal était le fait que la protection ne pouvait être induite que par l'inoculation des sporozoïtes viables, par voie intraveineuse, capables d'envahir un hépatocyte et de s'y développer, et que les formes hépatiques issues de sporozoïtes irradiés persistaient (Ramsey et al., 1982). De plus, une élimination des stades hépatiques provoquait une susceptibilité aux infections par des sporozoïtes chez des animaux préalablement protégés (Londono et al., 1991; Scheller and Azad, 1995).

Le stade hépatique possède des caractéristiques uniques. L'hépatocyte est une cellule nucléée métaboliquement très active et exprime des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. La schizogonie hépatique entraîne la formation d'entre 10.000 et 30.000 mérozoïtes alors que 4 à 32 mérozoïtes sont libérés par un schizonte sanguin. Les mérozoïtes issus de ces deux stades ont des différences morphologiques, mais on ne sait pas s'il existe des différences fonctionnelles ou moléculaires, car seuls les mérozoïtes sanguins ont pu être extensivement étudiés.

Du fait que dans le foie, seuls quelques hépatocytes sont infectés et qu'*in vitro*, les techniques de culture restent délicates et difficiles, ceci a constitué un obstacle majeur au développement des connaissances sur le stade hépatique et à la recherche d'antigènes exprimés à ce stade.

#### 1.4 Criblage d'antigènes spécifiques de stade

La première stratégie pour établir l'expression spécifique de stade est la génération de banques d'ADN complémentaires à partir d'ARN messagers des différents stades. Ceci a été accompli plusieurs fois aux stades sanguins (Chakrabarti et al., 1994; Watanabe et al., 2001) et plus récemment une fois au stade sporozoïte (Fidock et al., 2000). Cependant, cette approche n'est pas possible pour le stade hépatique des plasmodies humains. Un autre moyen est la génération d'anticorps spécifiques dans des modèles animaux. Ceci est facile aux stades érythrocytaires mais pour le stade hépatique, plusieurs tentatives ont

échoués, car les injections de stades hépatiques de *P. falciparum* n'ont induit que très peu d'anticorps dans les souris. Une dernière approche est le criblage immunologique basé sur l'utilisation d'anticorps d'individus naturellement immunisés. Cette approche a permis de mettre en évidence pour la première fois  
5 que d'autres antigènes que la CS étaient présents à la surface du sporozoïte (Galey et al., 1990).

### **1.5 Stratégie élaborée dans le laboratoire d'identification d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires**

10 Afin de contourner la difficulté de criblage aux stades pré-érythrocytaires, une stratégie de criblage d'antigènes de *P. falciparum* potentiellement exprimés dans les stades sporozoïte et hépatique a été développée (Marchand and Druilhe, 1990).

Le principe était de chercher des individus chez lesquels la réponse  
15 immune prédominante était contre les stades pré-érythrocytaires. Nous avons ainsi obtenu des sérums d'individus (sérums PM) vivant en zone d'endémie depuis plus de 20 ans et n'ayant jamais eu d'accès cliniques car ils étaient en permanence sous traitement prophylactique à la chloroquine (schizonticide efficace contre les stades sanguins, mais sans effet sur les stades hépatiques).  
20 Les sérums correspondants ne reconnaissaient en effet que très faiblement des stades sanguins en Western Blot et en IFI (titres inférieurs à 1/200), tandis que les titres contre les stades sporozoïtes et hépatiques du parasite étaient compris entre 1/3200 et 1/6400 en IFI et ils marquaient plusieurs polypeptides sur des extraits protéiques de sporozoïtes de *P. falciparum*; il s'agissait donc de sérums  
25 contenant des anticorps spécifiques des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires.

Ces sérums ont été utilisés pour cribler une banque génomique de *P. falciparum* (construite par Odile Mercereau Puijalon). L'ADN génomique issu du clone parasite T9-96 a été méthylé et digéré par la Dnase 1, et les fragments  
30 d'une taille allant de 200 à 2500 paires de bases ont été introduits dans le site *EcoR1* du phage  $\lambda$ gt11 (Guérin-Marchand et al., 1987).

Parmi les 7 millions de fragments d'ADN générés, 2000 clones produisant un antigène recombinant reconnu par des sérums hyper immuns (SHI) d'individus immuns vivant en zone d'endémie, ont ensuite été criblés avec les sérums PM. 120 clones ont ainsi été sélectionnés et l'expression de stade des  
 5 antigènes correspondants a été déterminée par des tests d'IFIs, avec des anticorps humains immunopurifiés sur chaque protéine recombinante, sur les sporozoïtes, les stades hépatiques et les stades sanguins de *P. falciparum*, *P. yoelii* et parfois avec *P. berghei* et *P. vivax*.

Le premier antigène à être étudié et contre lequel les réponses humorales  
 10 étaient les plus élevées dans plusieurs sérums d'individus vivant dans une zone d'endémie était le Liver Stage Antigen 1, LSA-1 (Guérin-Marchand et al., 1987). Il demeure le seul antigène caractérisé à être exprimé uniquement au stade hépatique.

A la suite du LSA-1, 3 antigènes STARP, SALSA et LSA-3 ont été  
 15 sélectionnés à partir de divers critères et caractérisés au niveau moléculaire (Bottius et al., 1996; Daubersies et al., 2000; Fidock et al., 1994a), et immunologiquement par L. Benmohammed, K. Brahimi, J.P. Sauzet et B. Perlaza. (BenMohamed et al., 1997; Perlaza et al., 1998; Sauzet et al., 2001). Ces antigènes sont exprimés aussi bien à la surface du sporozoïte qu'au stade  
 20 hépatique.

Le LSA3 est l'unique antigène reconnu différenciellement par des sérums de volontaires ou de chimpanzés protégés par l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés. Il est le seul à avoir induit une protection stérilisante et de longue durée chez des chimpanzés (Daubersies et al., 2000), et sera bientôt  
 25 testé dans des essais cliniques de phase I et II.

## **2) MATERIEL ET METHODES**

### **2.1. Techniques de biologie moléculaire**

#### **2.1.1. Souches bactériennes**

DH5 $\alpha$ : *supE44  $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi- 1 relA1*.

### 2.1.2. Souches de parasites:

NF54 issue d'un isolat de malade européen infecté en Afrique (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

3D7, la souche référence utilisée dans le projet génome, est un clone issu  
5 de la souche (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

T9.96, une souche provenant d'un patient thaïlandais ATCC : MRA153 ,  
(Thaithong et al., 1984)

Pour les tests de polymorphisme, des souches distinctes ont été  
employées: B1 (Brésil); F32, D7, D28, D50 issues de la Tanzania; D28 du  
10 Sénégal, D41 de l'Inde, D51 de Myanmar, L1 de Libéria, H1 de Honduras,  
Mad20 de Papua New Guinea, et PA de Palo Alto, d'Amérique du Sud Ouest.  
(Stricker et al., 2000).

Les sporozoïtes sont issues de la souche NF54 et obtenus par passage  
dans des *Anopheles Gambiae* REF

15

### 2.1.3. PCR à partir d'extraits de phages ou d'ADN de phages

Le Expand High Fidelity Kit™ (Mannheim Boehringer, Allemagne) a été  
utilisé comme indiqué par le fournisseur avec 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3.5 unités de Taq  
polymérase, 0.2 mM de desoxyribonucléotides (dNTP), 50 nM des amorces 21D  
20 en 5' (CCTGGAGCCCGTCACTATCGGCGG) et 26D en 3'  
(GGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGG) et 2 µl d'ADN purifié ou d'extrait de  
phage. La réaction a comporté une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C,  
suivie par 35 cycles consécutifs de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30  
secondes d'hybridation à 50 °C, et 2 minutes d'élongation à 68 °C. Le circuit  
25 cyclique a été suivi par une incubation à 68 °C pendant 5 minutes.

#### 2.1.3.1 Sous-clonage dans les vecteurs histidine, pNAK et Topo

Selon la qualité du produit d'amplification des phages, trois procédures ont  
été employées:

30

Les produits PCR présentant un smear ou un rendement très petit et étant  
de plus petite taille quasi impossible à détecter en digérant l'ADN du phage  
correspondant, ont été clonés par l'intermédiaire d'un vecteur permettant un

clonage direct du produit PCR sans digestion successive d'une enzyme de restriction à l'aide du kit de TopoTA Cloning™ (Invitrogen, Les Pays-Bas). Le clonage Topo a aussi été effectué pour les fragments dont nous voulions uniquement déterminer la séquence.

5 Les produits PCR de tailles inférieures à 1 Kbp ont été digérés, précipités à l'éthanol, et resuspendus dans la moitié du volume initial d'H<sub>2</sub>O, puis digérés par 10 U de l'enzyme de restriction *EcoR*1, pendant 1 heure à 37 °C, tirés sur un gel d'agarose à 2 %, purifiés sur gel par la procédure de gel extraction kit de Qiagen, donnant un volume de 50 µl.

10 Les produits PCR peu abondants de grande taille (supérieurs à 1000 bp) ont été isolés à partir de l'ADN de phage purifié par une digestion avec *EcoR*1, puis par extraction de l'insert du gel d'agarose.

#### 2.1.3.2 Étude du polymorphisme du gène dans des souches parasitaires différentes.

15 Les amorces suivantes ont été utilisées pour identifier les polymorphismes en taille de régions spécifiques correspondant aux antigènes étudiés.

747-1: AAAAGTGATGATAGAAATGCTTGTG (5'

747-2: TTTTGTTGATCTTACTTATTTCAAC (3')

20 772-1: CGGAATCAGGTTTAAATCCAAC (5')

772-2: AGATCGTTTTTCATCAGGGGG (3')

La réaction cyclique a été effectuée avec un programme comportant une étape initiale d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, suivie par 39 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, une hybridation à 52 °C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une  
25 étape de 5 minutes à 72°C a terminé la réaction.

Les PCR ont été effectuées sur un Crocodile III de Appligène. Les produits ont ensuite été analysés sur gel d'agarose.

#### 2.1.4. Purification d'ADN

##### 2.1.4.1 Pour les analyses de recombinants

Les colonies positives en PCR ont été inoculées dans 3 ml de milieu contenant l'antibiotique correspondant au vecteur utilisé (100 µg/ml ampicilline pour Topo et Histidine, 20 µg/ml kanamycine pour le vecteur Vical) et 2 ml d'inoculum ont été utilisés dans la préparation d'ADN plasmidique avec le Qiagen™ Miniprep Kit. L'ADN obtenu a successivement été digéré avec les enzymes de restriction utilisées dans le clonage et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, afin de détecter l'insertion du fragment.

##### 2.1.4.2 Pour l'isolement de fragments:

100 ml de milieu Luria Broth supplémenté en antibiotique approprié ont été inoculés avec 1 colonie de bactérie comportant le recombinant, et incubé à 37 °C sur la nuit dans un bain thermostaté en agitation vigoureuse. Le lendemain, la culture bactérienne a été récoltée et l'ADN plasmique purifié comme décrit (Qiagen maxiprep™, Qiagen, Allemagne).

##### 2.1.4.3 Pour l'immunisation de constructions ADN nu

Afin d'éliminer les endotoxines, qui sont présents dans les bactéries et qui peuvent entraîner des réponses non spécifiques lors des immunisations de souris, l'ADN des constructions a été purifié à partir de 2 l de culture de bactéries recombinantes, par Qiagen EndoFree Plasmid Giga™ kit (Qiagen, Allemagne).

##### 2.1.4.4 Pour la purification d'ADN de phages recombinants

Les phages ont été réamplifiés sur des boîtes d'agarose de LB, en déposant 5 µl sur du Topagar pris avec 200 µl d'inoculum de Y1090, et en laissant à 37 °C sur la nuit.

Ensuite, une quantité plus grande a été produite en culture liquide. D'abord, une plage piquée sur la boîte a été incubée avec 200 µl d'inoculum de Y1090, laissée à 37 °C avec agitation pendant 15 minutes. Ensuite, 5 ml de milieu sans antibiotique supplémenté avec 10 mM de MgSO<sub>4</sub> a été ajouté, et la culture laissée en agitation pendant 4 heures, jusqu'à l'apparition de lyse. 50 µl

de Chloroforme a été ajouté, et le tout centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant libéré des débris cellulaires a été récupéré. Ce stock a été utilisé dans la production de 500 ml de phage en culture liquide : l'équivalent de  $7.5 \cdot 10^8$  pfu (unités formant des plaques) a été ajouté à 500 µl de  
 5 cellules d'une culture inoculée sur la nuit de Y1090, et 500 µl de 10 mM  $MgCl_2/CaCl_2$ . Tout a été incubé à 37 °C 15 minutes, et ajouté à 500 ml de milieu LB sans antibiotique. La lyse des bactéries observée par l'apparition de filaments dans la culture a été suivie jusqu'à la lyse totale (4-5h). Ensuite, la culture a été centrifugée à 6000 g pendant 15 minutes à 4 °C, le surnageant récupéré, et  
 10 stocké à 4 °C sur la nuit.

Le lendemain, la purification de l'ADN a été entreprise avec le Lambda Maxi Kit (Qiagen, Allemagne) avec des ajustements en début de protocole à cause du volume plus grand de surnageant de départ. Le culot final a été resuspendu dans 500 µl de tampon TE.

15

#### 2.1.4.5 À partir de parasites

100 µl de culot de culture de globules rouges à 10 % de parasitémie, a été resuspendu dans 100 µl de PBS, pH 7,2 et purifié par le Qiaamp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Allemagne). A partir de 100 µl de culot d'une culture parasitée à 10 %,   
 20 on a obtenu environ 5µg d'ADN.

#### *2.1.5. Purification d'ARN total parasite*

Nous avons utilisé deux méthodes en fonction de la quantité d'ARN voulu. Pour des quantités importantes, la méthode décrite par (Kyes et al., 2000) a été employée, tandis que pour obtenir des préparations de quantités plus restreintes,   
 25 nous avons utilisé le RNeasy kit™ (Qiagen, Allemagne.)

#### *2.1.6. RT-PCR.*

La RT-PCR a été effectuée avec le kit RT-PCR de Qiagen (Allemagne). Des amorces spécifiques pour chaque gène et situées, si possible, de telle façon   
 30 que l'on puisse distinguer entre les produits issus d'amplification d'ADN génomique et d'ARN (autour des introns) ont été utilisées. Une première réaction



de Transcription réverse a été effectuée à 50 ° C pendant 30 minutes, puis une réaction de PCR a été effectuée, dans les mêmes conditions que celle décrites pour une PCR d'ADN de parasite avec les amorces sélectionnées, parfois suivi d'une deuxième réaction (nested PCR) avec des amorces situées dans la séquence du premier produit PCR amplifié. Cependant, la température d'hybridation varie en fonction des amorces utilisées (entre 50 et 60 ° C).

#### 2.1.7. Purification des recombinants histidine

2 l de milieu de Luria Broth additionné avec l'ampicilline à 100 ng/ml a été inoculé avec 50 ml de culture de bactérie contenant le plasmide recombinant. La croissance des bactéries a été suivie par la mesure de la turbidité bactérienne à 600 nm et à la densité optique voulue (entre 0,5 et 1) une concentration d'IPTG variant entre 0,5 et 1 mM selon le recombinant a été ajoutée à la culture, et l'induction a duré entre 2 h et 4 h.

Ensuite les cellules ont été récoltées et le culot de bactéries resuspendu dans un tampon de 20 mM de NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, et 8 M d'urée (TU) (25 ml/litre de culture bactérienne). Ensuite, la suspension de cellules a été soumise à des sonications de 10 chocs de 1 minute chacun, et le surnageant contenant les protéines recombinantes a été récupéré par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes, et filtré à 0.22 µm. Ensuite, une étape de purification par affinité sur une colonne de Nickel a été effectuée. Une colonne de 1 ml (HiTrap™, Pharmacia, Suède) a été lavée comme indiqué par le fournisseur et 1 ml de NiCl<sub>2</sub> a été appliqué, suivi par d'autres lavages. Ensuite, la colonne a été lavée avec 5 ml de TU, et le surnageant appliqué sur la colonne. Ensuite, un lavage de 10 ml de TU a été effectué, et le recombinant élué par un gradient croissant en imidazole, compétiteur de l'histidine. Selon le recombinant purifié, des concentrations différentes ont été employées, et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ensuite, le pool de protéines a été dialysé contre un tampon L-histidine pH 6, et chromatographié sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q™, Pharmacia, Suède) afin d'éliminer une partie des Lipo Poly Saccharides (LPS) ou endotoxines qui induisent des réponses non spécifiques (Morrison and Ryan, 1987).

**Tableau de purification des recombinants histidine**

Recombinant	Induction <sup>1</sup>			DO après induction	Emplacement de la protéine, Poids moléculaire <sup>2</sup>	Imidazole (mM) <sup>3</sup>	NaCl (mM) <sup>4</sup>
	DO	IPTG	Temps				
747	0.5	0.5	4h	2.7	Mem, 18	50	360
772	0.5	0.5	4h	2.2	SN, 35	36	120

1 : La DO mesurée à 600 nm, La concentration en IPTG (mM) ; et le temps d'induction avant récolte.

2 : Après sonication, et centrifugation d'une suspension de bactéries ne contenant pas d'urée (8M) dans le tampon, le surnageant et le culot contenant les débris de membranes bactériennes ont été testés en Western blot afin de détecter où la protéine recombinante se trouvait. En présence d'urée toutes les protéines étaient solubles, et les procédures de purification ont donc été appliquées en présence de 8 M d'urée.

3 : La concentration d'imidazole à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Ni™

4 : La concentration de NaCl à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Q™

## **2.2. Techniques immunologiques**

### **2.2.1. ELISAs (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay)**

Les conditions optimales ont été déterminées avec 100 µl de solution d'antigène d'une concentration de 10, 5 ou 1 µg/ml coatés sur les plaques dans 50 mM de Carbonate pH 9.6 ou 1X PBS pH 7.4 en incubant les plaques sur la nuit à 4 °C. La saturation a été effectuée, soit en PBS supplémenté par 3 % de lait écrémé, ou 1% de BSA (albumine de sérum de veau) à température ambiante ou à 37°C pendant 2 heures. La dilution de sérums de 100 ou de 200 fois a été effectuée soit avec du PBS/lait à 1.5 % , soit avec du PBS/BSA 1%, et l'incubation a été faite à température ambiante ou à 37°C pendant 1 h.

L'incubation avec les anticorps secondaires couplés à la HRPO (peroxidase de navet) dilués au 1/2000 dans le tampon de dilution des sérums a été effectuée à température ambiante, et les révélations ont été faites à l'aide des tampons de TMB (peroxidase substrate et peroxidase solution B) (Laboratoires Kirkegaard et Perry, USA) mélangés volume à volume immédiatement avant utilisation dont 100 µl ont été distribués dans chaque puit. Les réactions colorées en bleu ont été arrêtées en ajoutant le même volume d'une solution d'1 M d'acide phosphorique. Les réactions sont lues à 450 nm dans un lecteur Multiscan Ascent™ (Labsystems).

Les résultats des souris sont exprimés en Ratio (unité arbitraire par rapport aux taux des réponses dans des témoins naïfs) et dans les expériences où les taux des isotypes ont été étudiés, par rapport au Ratio des IgG totaux déterminé dans la même expérience.

5

### 2.2.2. Immunopurification d'anticorps spécifiques

Pour l'immunopurification d'anticorps spécifiques contre les recombinants His<sub>6</sub>, une méthode décrite par (Brahimi et al., 1993) a été employée. 100 µl/puits de solution d'antigène dans du PBS, pH 7.2, à une concentration de 5 µg/ml ont été adsorbés sur plaques Nunc Maxisorp™ (Nunc, Danemark), et les plaques incubées à +4 °C la nuit. Ensuite, des sérums hyperimmuns ont été incubés à une dilution de 1/50 pendant 1 heure à température ambiante, les plaques lavées et l'élution des anticorps effectuée par ajout de glycine pH 2.5 à 0.2 M, incubation pendant 3 minutes et récupération suivie par une neutralisation du pH avec du Tris, 1M, pH 11. L'immunopurification à partir de recombinants de fusion β-galactosidase a été effectuée sur des filtres de nitrocellulose, comme décrit (Beall and Mitchell, 1986).

### 2.2.3. SDS-PAGE et Western Blot

En fonction des échantillons à tester, des gels de pourcentage d'acrylamide (BioRad™ 29.1:1 ratio) variables (5, 7.5, 10 ou 12 %) ont été utilisés. Après migration en tampon Tris/glycine (pH 8.5) avec le kit minigel (Biorad, USA) les gels ont soit été colorés par bleu de Coomassie soit soumis à un transfert sur filtres de nitrocellulose (0.45 µm), dans la cellule Trans-Blot (BioRad.)

Après transfert, les protéines ont été visualisées par une coloration avec 0,2 % de rouge Ponceau dans une solution d'acide acétique (5%), puis le filtre a été saturé en TBS/lait écrémé à 5 % pendant 30 minutes. Les anticorps humains immunopurifiés sans dilution, et les sérums dilués 1/100 ou 1/200 dans du TBS/lait 5%/ Tween™ 0,05% ont été incubés pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Ensuite, le filtre a été lavé 3 fois 10 minutes en TBS/Tween 0,05 %, et incubé avec les antisérums couplés à la phosphatase

alcaline dilués 1/5000, pendant 30 minutes. Après lavage dans le même tampon, les réactions colorées ont été produites par l'ajout de NBT (330 µg/ml) et de BCIP (165 µg/ml) (Promega, Allemagne) dilués dans du tampon Tris pH 9.

#### 5 2.2.4. IFI (*Immunofluorescence indirecte*)

Toutes les incubations à 37°C ont été effectuées dans une chambre humide afin d'éviter l'assèchement des tissus ou cellules à étudier. Les tampons ont été filtrés par un filtre à 0,22 µm afin d'éviter des contaminations par d'autres microorganismes et des bruits de fond.

10

##### 2.2.4.1 Stade sporozoïtes

Après dissection des glandes salivaires de moustiques infectés avec le parasite, les sporozoïtes ont été fixés avec 0.01 % de glutaraldehyde en PBS et lavés soigneusement en PBS.

15

Afin d'étudier le marquage uniquement en surface des sporozoïtes, (Galey et al., 1990) a développé une technique permettant une fixation « humide » avec une suspension de sporozoïtes attachés à la polylysine. Les lames de titration (PolyLabo, France) ont été coatées avec 1 µl d'une solution de 50 mg/ml de polylysine, puis laissées sécher une nuit à 37°C. 1 µl d'une suspension de sporozoïtes (20 /µl) a été déposée sur chaque puits, et incubé dans une chambre humide à 4°C sur la nuit. La détection d'une présence intra-parasitaire a été faite par fixation des sporozoïtes dans l'acétone.

20

##### 2.2.4.2 Stade hépatique

Les coupes fixées au Carnoy et paraffinées ont été préparées par 3 bains de Xylène de 10 mn chacun, 3 bains d'alcool absolu de 5 mn chacun, 2 bains d'eau distillée de 5 mn chacun, et séchées à l'air libre. Ensuite, les coupes ont été réhydratées pendant 10 mn dans du PBS pH 7.4 filtré. Les coupes à congélation ont été fixées 10 minutes en acétone.

25

30

### 2.2.4.3 Stade sanguin.

Les frottis sanguins ont été fixés 10 minutes à l'acétone, et des cases pour chaque échantillon à tester ont été délimitées en dessinant des bords avec un marqueur Pentel-rouge sur le frottis.

- 5 La suite de la technique a été identique pour les trois stades: Après fixation, les anticorps à tester (dilués dans du PBS) ont été déposés sur chaque puit, coupe ou case, et la lame incubée à 37°C en chambre humide pendant 1 heure. Les lames ont été lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, puis incubées avec un anti-IgG anti-humain ou souris (selon les anticorps spécifiques
- 10 utilisés), couplé à la fluorescéine (Alexis) dilué 1/200 dans du PBS et du bleu d'Evans 1/50000, incubées 30 minutes à 37°C en chambre humide, lavées trois fois en PBS 1X, et couvertes par une lamelle après qu'une goutte de tampon glyciné (PBS 30 % glycérol) ait été déposée. La lecture de la lame a été effectuée au microscope à U.V (Olympus, BH2))

15

### 2.2.5. Immunisations de souris

#### 2.2.5.1 Par les recombinants histidines

- Les protocoles a, b et c ont essentiellement été appliqués pour obtenir des sérums spécifiques, tandis que les protocoles b, c et d ont été employés afin
- 20 d'effectuer des infections d'épreuve par *P. yoelii*.

#### a) Adjuvant IFA/Alum

- Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 1 première injection intra-péritonéale de 500 µl, avec 1 mélange de 20 µg d'antigène (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-680, His<sub>6</sub>-747. His<sub>6</sub>-772), 2 mg/ml d'Alum (Al(OH)<sub>3</sub>, et de l'Adjuvant incomplet de Freund (AIF), volume dans volume, supplémenté avec 0.9% de NaCl.
- 25

Les 2 injections suivantes, chacune à 15 jours d'intervalle, ont été effectuées avec la même quantité d'antigène dans le même volume, mais sans AIF, et avec de la méthiolate, un conservateur, à 0.05%.

- 30 Les souris ont été prélevées (500 µl) avant l'immunisation 2 semaines, 1 mois et 6 semaines après la première immunisation, sur EDTA et les plasma récupérés et stockés à -20°C.

## b) CFA

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 3 injections sous-cutanées tous les 15 jours à la base de la queue d'un mélange constitué par 100 µl d'adjuvant complet de Freund et de 10 µg d'antigène (His<sub>6</sub>-114 ou His<sub>6</sub>-662) dans 100 µl de PBS. 1 semaine après la troisième injection, les sérums des souris ont été prélevés et les réponses testés en ELISAs contre le recombinant et en IFI sur les sporozoïtes. 18 jours après la dernière injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelli*.

10

c) SBAS<sub>2</sub> (Adjuvant Smith and Klein Beecham)

Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué par 57 µl d'adjuvant mélangé avec 43 µl d'antigène (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-747 ou His<sub>6</sub>-772) correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

15

## d) Microparticules

Les solutions d'antigènes (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-747 ou His<sub>6</sub>-772) ont été adsorbées sur des microparticules en polystyrène de 0.5 µm de diamètre (Polysciences Inc, USA) par incubation à 37 °C en agitation pendant 4 heures dans une solution de glycine, pH 8.0. L'adsorption de l'antigène a été vérifiée par la capacité des micro-billes d'agglutiner avec un sérum spécifique à l'antigène adsorbé. Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué de microbilles coatés avec l'antigène correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

20

25

30

#### 2.2.5.2 Par les recombinants ADN

Des souris BALB/c et C3H de 6 semaines ont été injectées 3 fois à 8 semaines d'intervalle par voie intramusculaire avec 100 µl d'antigène (pNAK114, pNAK249, pNAK438, pNAK571, pNAK747, pNAK772) dans du PBS pH 7.4, puis  
5 une 4ème fois 12 semaines après la 3ème injection. Les prélèvements de sang ont été effectués 1 semaine après la 3ème et la 4ème immunisation sur EDTA, et les sérums récoltés après une incubation du prélèvement la nuit à 4°C.

Les rates de 3 souris /groupe ont été prélevées après la 4ème immunisation, et les stimulations des réponses cellulaires étudiées. Après un  
10 5ème boost, 8 semaines après la 4<sup>ème</sup> injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

#### *2.2.6. Infection d'épreuves par sporozoïtes et par stade sanguin*

Les sporozoïtes issus de moustiques *Anopheles stephensi* infectés par le  
15 clone 1.1 de *P. yoelii yoelii* ont été obtenus par une méthode (Ozaki et al., 1984) qui consiste en l'isolement de la cage thoracique du moustique et l'obtention par centrifugation à travers de la laine de verre des sporozoïtes, qui ont été lavés par des resuspensions successives en PBS après centrifugation.

Les souris ont été infectées par des sporozoïtes de *P. yoelii* par voie rétro  
20 orbitale avec 150 à 200 sporozoïtes (200 µl/ injection), et la parasitémie suivie par des frottis du jour 3 suivant l'infection jusqu'au 12ème jour post-infection, aussi bien sur les animaux immunisés que sur des souris naïves infectées par le même lot de sporozoïtes.

Des stades sanguins prélevés sur d'autres souris infectées par *P. yoelii*  
25 ont été lavés dans du PBS, et l'équivalent de  $5 \times 10^4$  parasites ont été injectés par voie intrapéritonéale.

#### *2.2.7. Étude des réponses cellulaires.*

Afin d'étudier aussi bien l'induction de prolifération de cellules-T  
30 spécifiques ainsi que la sécrétion de cytokines capables de stimuler la réponse immune, nous avons étudié la stimulation de splénocytes de souris par les antigènes et la sécrétion d'IFN-γ par ces cellules.

### 2.2.7.1 Proliférations de lymphocytes T

Les rates ont été prélevées sur les souris, les suspensions de splénocytes ont été lavées deux fois dans du RPMI 1640 (Gibco, France) et les cellules resuspendues à une concentration finale de  $5 \times 10^6$  cellules /ml dans du RPMI 5 supplémenté avec 100 U/ml pénicilline, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1,5% sérum de veau foetal (SVF) et 0,5 % de sérum de souris normal. 100 $\mu$ l/puits de chaque suspension a été distribuée dans des plaques de 96 puits à fond rond (Costar, USA) et les protéines recombinantes à 10 tester ont été ajoutés à une concentration de 50 mg/ml. Ces tests ont été effectués en triplicat. Après 48 h d'incubation, (37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>), 50 $\mu$ l/puit de surnageant de culture a été prélevé et stocké à -70 °C avant la détermination de titres d'IFN- $\gamma$ . 50  $\mu$ l/puit de surnageant a été prélevé pour dosage de cytokines. Afin de détecter la réplication d'ADN due à une stimulation de division, 15 50  $\mu$ l d'une solution de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H) (Amersham Life Science, England) à 1 $\mu$ Ci/puit a été ajoutée durant les 12 dernières heures d'incubation. Les cellules ont été récoltées dans un récolteur de cellules automatique (Skatron Inc, Sterling, VA, USA), et l'incorporation de Thymidine <sup>3</sup>H quantifiée par scintillation. Les résultats sont exprimés en Index de Stimulation (I.S.) et la prolifération a été 20 considérée comme positive, lorsque le S.I. est au dessus de 2.

### 2.2.7.2 Détection de sécrétion d'interféron $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Les titres d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants de culture ont été déterminés par un méthode d'ELISA à double capture. Des plaques Maxisorp (Nunc, Danemark) 25 à fond plat ont été coatées par un anticorps monoclonal de rat anti- IFN- $\gamma$  de souris primaire (R4-6A2) (Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans un tampon de 0.1 M de carbonate, pH 9.6, et laissé sur la nuit à 4 °C. Entre chaque étape de la procédure, les plaques ont été lavées plusieurs fois avec du tampon PBS supplémenté avec 0,05 % Tween™ (PBS-T). Ensuite, les plaques ont été 30 saturées avec 3% d'albumine de sérum de veau (BSA, Sigma Chemicals, St Louis, USA) dans du PBS-T. Des surnageants non-dilués ont été ajoutés aux puits et les plaques incubées sur la nuit à 4°C, suivi par une incubation d'1 h à



température ambiante avec un anticorps monoclonal rat anti-souris IFN- $\gamma$  secondaire biotinylé (XMG1.2, Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans du PBS-T. Les étapes de marquage avec des anticorps couplés à la peroxidase sont identiques à celles utilisées dans la technique de l'ELISA. (A.2.1)

5

#### 2.2.7.3 Détection de cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$ par Elispot

Le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$  a été déterminé dans des splénocytes non stimulées 40 heures après qu'elles soient fraîchement isolées et incubés avec les antigènes. Des plaques de microtitrage (Multiscreen-HA™, plaque stérile, Millipore) ont été coatées par 50  $\mu$ l d'une solution contenant 5  $\mu$ g/ml d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  (18181D, Becton Dickinson Co). Après une incubation sur la nuit à 4 °C, les puits ont été lavés et saturés par une solution de 5 % de SVF. Des suspensions de cellules de  $5 \times 10^5$  cellules/puit ont été incubées avec l'antigène à 50  $\mu$ g/ml dans un volume total de 200  $\mu$ l pendant 40 h, à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les plaques ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS-T et 3 fois avec du PBS seul et les puits ont alors été coatés par 50  $\mu$ l de solution d'anticorps anti-souris IFN- $\gamma$  biotinylé (Becton Dickinson Co, USA) dilué au 1/200 et incubé sur la nuit à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées de la même façon que précédemment, avant un ajout de 50  $\mu$ l par puit de phosphatase alcaline couplée à la streptavidine (Boehringer-Mannheim, Allemagne) à une dilution de 1/2000 dans du PBS. Après 1 h d'incubation, et lavage des plaques, des spots ont été détectés par développement d'une réaction colorée avec les réactifs BCIP/NBT à 50  $\mu$ g/ml à l'endroit où des cellules individuelles ont sécrété de l'IFN- $\gamma$ . Les résultats sont exprimés comme le nombre de cellules formant des spots par rapport aux  $5 \times 10^6$  splénocytes.

#### 2.2.8. Sérums et cellules

##### 2.2.8.1 D'individus naturellement exposés au parasite.

30 10 sérums provenant d'adultes vivant dans une forte zone d'endémie (Côte d'Ivoire) et naturellement protégés ont été employés dans des études

d'ELISA et des immunopurifications d'anticorps spécifiques aux antigènes étudiés.

Des sérums provenant d'individus de deux tranches d'ages allant de 0 -9 ans ou au dessus de 12 ans, ont été sélectionnés des Villages Ndiop et Dielmo (Rogier and Trape, 1995; Trape et al., 1994). Ndiop est situé dans une zone d'endémie qui compte environ 20 piqûres infectieuses/an, et Dielmo, dans une zone qui compte 150 piqûres infectieuses/an. Chaque sérum dans une des deux régions correspond en age et en sexe à un sérum de l'autre région.

#### 10 2.2.8.2 D'animaux ou d'humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés.

Deux chimpanzés ont été immunisés soit avec des sporozoïtes irradiés à 18 kRad, soit à 30 kRad par 4 injections de  $5 \times 10^6$  sporozoïtes chacune par voie intravéneuse. Les 3 premières immunisations ont été effectuées avec 1 mois d'intervalle, tandis que la 4<sup>ème</sup> a été effectuée 4 mois après la 3<sup>ème</sup>. Leur sérum et les cellules du sang périphérique ont été étudiés dans des tests de réponses cellulaires et de réponses humorales après 3 immunisations. Les deux animaux ont été infectés par l'injection intravéneuse de  $4 \times 10^4$  sporozoïtes (faible dose) chacune de *P. falciparum* et seulement le chimpanzé immunisé avec les sporozoïtes irradiés à 18 kRad a été protégé (n'a pas développé de parasitémie sanguine)

Deux volontaires humains immunisés par le même moyen, ont reçu un rappel avec un nouveau lot de sporozoïtes irradiés, et les cellules du sang périphérique ont été étudiées dans des tests d'Elispot. De plus, le sérum de 4 volontaires humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés a également été à la disposition de la Demanderesse.

#### 2.2.8.3 D'individus exposés différemment au parasite

Nous avons à notre disposition des sérums de 8 individus exposés naturellement au parasite mais sous traitement de chloroquine permanent, ce qui élimine les stades sanguins à une forme très précoce et des sérums de 5 individus accidentellement infectés par la transfusion de sang infecté par *P. falciparum*.

### **3) RESULTATS**

#### **3.0: Exemple 1**

##### **Identification de deux antigènes nouveaux DG47 et DG772 de *P. falciparum* reconnus par des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradié**

Les clones DG 747 et DG772 ont été sélectionnés non seulement à cause des critères initiaux posés (détection sur les sporozoïtes et le stade hépatique, ainsi qu'une reconnaissance par des sérums hyperimmuns), mais parce que plusieurs caractéristiques supplémentaires nous ont intéressés : le DG747 n'avait aucune réactivité croisée avec d'autres protéines de la banque PM, et le DG772 n'avait qu'une seule réactivité croisée, avec LSA1, le seul antigène identifié comme exprimé uniquement au stade hépatique de *P. falciparum*. De plus, des anticorps spécifiques des deux protéines marquaient des sporozoïtes de *P. yoelii*.

Un séquençage initial a révélé que ces deux clones contenaient des inserts appartenant à des gènes jusqu'ici inconnus, mais dont la séquence était disponible sur les bases de données du génome de *P. falciparum*. Nous nous sommes donc consacrés au travail de la caractérisation moléculaire d'expression du stade, de la conservation du gène, ainsi qu'à un travail de caractérisation immunologique (antigénicité, immunogénicité) de ces nouveaux antigènes. Les résultats ont montré que a) ces deux antigènes induisent une réponse immune chez des individus ou des animaux uniquement exposés aux stades pré-érythrocytaires aussi bien artificiellement (par immunisation) que naturellement (sur le terrain), b) qu'ils sont reconnus par des sérums d'individus naturellement exposés au cycle entier du parasite, aussi bien dans des zones de faible que de forte endémie. De plus, nous avons évalué chez la souris leur potentiel immunogène et protecteur par l'immunisation et l'infection d'épreuve par *P. yoelii*.

#### **3.1. Analyse des séquences**

DG747 code pour un polypeptide de 59 acides aminés dont les 40 acides aminés (aa) C-terminaux font partie d'une structure répétitive de 5 x 8 aa riches en arginine et en lysine. Cette séquence est identique aux aa 81-140 du gène PfB0155c (1524 pb, 508 aa) situé sur le chromosome 2 (figure 3.1a). Ce gène qui

code pour une protéine putative (Gardner et al., 1999), ne comporte ni introns, ni peptide signal prédits, ni de régions homologues à d'autres protéines qu'elles soient de *Plasmodium* ou d'autres organismes. La protéine correspondante a une masse moléculaire théorique de 59 kDa, et un point isoélectrique neutre (7.5),  
 5 mais certaines régions ont des pI très variables, par exemple la région retrouvée dans DG747 a une charge positive à pH neutre.

DG772 contient un insert de 333 pb, qui sont traduits en 111 aa contenus dans un cadre de lecture ouvert. Ce polypeptide correspond à la région des aa 1146-1256 d'une protéine de 1493 acides aminés codée par un gène situé sur le  
 10 chromosome 1 (figure 3.1b). La masse théorique de la protéine est de 173 kDa et le point isoélectrique est de 5.05. La protéine est constituée en majorité d'acides aminés polaires et ne contient pas de sites hydrophobes, à part dans la partie N-terminale, où il pourrait y avoir un site d'ancrage de GPI. Le gène ne contient pas de répétitions et la séquence nucléotidique traduite a une forte homologie avec  
 15 les protéines de la famille « EBP » (Adams et al., 1992), c'est-à-dire avec des régions 5'cys et 3'cys qui sont caractéristiques de cette famille.

### 3.2. Expression de stade et conservation du gène

Afin d'évaluer plus précisément l'expression de stade des deux protéines,  
 20 nous avons utilisé les techniques d'IFI et de Western blot sur des stades différents de *P. falciparum* et sur les parasites murins *P. yoelii* et *P. berghei*.

La surface des sporozoïtes de *P. falciparum* a été marquée par les anticorps (humains ou de souris) spécifiques de DG747 et de DG772, mais les stades érythrocytaires ont été marqués d'une façon différente pour les deux  
 25 groupes d'anticorps. Les anticorps anti-His<sub>6</sub>-747 (anti-747) marquent peu les stades jeunes, mais fortement les stades schizontes mûrs, avec un marquage localisé autour des structures knob (figure 3.2 image A), tandis que les anticorps anti-His<sub>6</sub>-772 (anti-772) marquent le parasite d'une façon plus homogène tout au long du stade érythrocytaire. Dans les espèces murines *P. yoelii* et *P. berghei*, la  
 30 surface des sporozoïtes a été fortement marquée par les anticorps spécifiques des deux antigènes.

Afin de définir les tailles des protéines détectées, nous avons aussi effectué un Western Blot des extraits protéiques de parasites sanguins de *P. falciparum* avec les mêmes anticorps (figure 3.3 a et b).

Les anticorps anti-747 marquent un polypeptide d'environ 70 kDa aussi bien dans  
5 les extraits d'anneaux que ceux de schizontes, tandis qu'aucune bande n'a été détectée dans les érythrocytes non parasités. Le polypeptide détecté par des anticorps anti-772 est plus grand, d'une masse moléculaire de 150 kDa, et est détecté aussi bien dans les anneaux que dans les schizontes. Le marquage d'extraits protéiques de *P. yoelii* a détecté un polypeptide de 70 kDa pour les  
10 anti-747 dans les sporozoïtes et les stades sanguins et un polypeptide de 60 kDa pour les anti-772, seulement détecté dans les sporozoïtes de *P. yoelii*.

De plus, afin de confirmer la présence des protéines et leur constance d'expression à la surface des sporozoïtes provenant de plusieurs parasites différents, nous avons examiné par IFI des lots de sporozoïtes provenant de  
15 différents isolats Thai de *P. falciparum*. Le sérum anti-772 a marqué tous les sporozoïtes, tandis que seulement 7 sur 10 des isolats testés étaient marqués par les anti-747. De même, des amplifications par PCR avec des amorces spécifiques pour les deux fragments de gène (indiquées dans les figures 3.1a et 3.1b) ont été effectuées avec de l'ADN issu de stades sanguins de 12 souches  
20 différentes de *P. falciparum* (figure 3.4). Les produits PCR correspondant au DG772 ont été amplifiés à partir des 12 échantillons et leur taille était similaire, tandis que les amorces spécifiques pour DG747 n'ont pu amplifier un fragment qu'à partir de 9 des 12 ADN. Il faut préciser que toutes les lignées de parasites utilisées dans ce travail (T9-96, NF54 et 3D7) contiennent les gènes  
25 correspondants. Ces résultats indiquent une variation au niveau de l'expression ou de la présence de DG747 dans des souches parasitaires, car au total, seulement 15 sur 22 parasites ont semblé contenir le gène du DG747 ou ont montré une réactivité positive en IFI. Une des amorces utilisées pour la détection du gène codant pour DG747 est situé dans la partie 3' des répétitions contenues  
30 dans le DG747, tandis que l'autre est située plus en aval ce qui pourrait expliquer l'absence d'amplification par PCR, s'il existait une variation au niveau du nombre de ces répétitions. Toutefois, les résultats restent à confirmer, de préférence sur

de l'ADN issu de parasites isolés sur le terrain, car tous les parasites testés en PCR ont été cultivés à plus ou moins long terme *in vitro*, ce qui peut entraîner des délétions au niveau chromosomal. Le phénomène de délétion a d'ailleurs aussi été observé dans des populations de parasites *in vivo* (Corcoran and  
 5 Kemp, 1986).

### 3.3. Reconnaissance par le système immunitaire humain dans des zones endémiques

En plus de l'étude de la constance d'expression de l'antigène, nous avons  
 10 étudié la prévalence des réponses humorales d'individus vivant dans des zones de forte (Dielmo) ou de faible (Ndiop) endémie, et dans deux groupes d'âge différents dans ces deux zones (figures 3.5a et 3.5b)

On observe une même prévalence (40 %) contre 747 dans la zone de faible endémie, sauf que le nombre d'individus qui répondent fortement (l'intensité de  
 15 réponse par rapport aux témoins) augmente avec l'âge. Dans la zone de forte endémie, le nombre de répondeurs contre 747 augmentent avec l'âge, ainsi que l'intensité de la réponse, et la prévalence chez les adultes, que l'on peut considérer comme ayant acquis une immunité, est de 85 %. De plus, ces réponses semblent corrélées avec l'exposition au sporozoïte, car le taux  
 20 d'anticorps est plus élevé chez les individus d'un groupe d'âge donné dans une zone de transmission plus forte. Toutefois, dans une même zone, la réponse n'a pas changé d'une façon significative durant des saisons de plus faible transmission (saison sèche) (résultats non montrés), ce qui pourrait correspondre à la réponse contre les stades sanguins et/ou indiquer que la réponse immune  
 25 anti-747 est de longue durée. La réponse induite par DG747 augmente en prévalence et en intensité en fonction de l'exposition et de la durée d'exposition au parasite (âge).

La réponse anti-772 augmente comme l'anti-747 en fonction de l'âge, mais avec une augmentation beaucoup moins importante, par rapport au taux de  
 30 transmission observé entre Ndiop et Dielmo et par rapport à l'âge. Le taux de réponses anti-772 mesuré en % de prévalence et en intensité est plus élevé pour

les individus de bas âge que celui des réponses anti-747, mais moins forte (75 %) que l'anti-747 (85 %) à Dielmo dans les individus immuns.

#### 3.4. Comparaison des réponses induites par des stades différents du parasite

Nous avons le privilège d'être en possession de cellules issues d'individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés, et de sérums provenant de personnes exposées de façon différente à l'infection parasitaire.

##### 3.4.1. Réponses cellulaires

Toutes ces études ont été effectuées en étroite collaboration avec Jean-Pierre Sauzet dans le laboratoire. Compte tenu du peu de matériel dont nous disposions, nous avons restreint les analyses afin de détecter ce que nous avons précédemment défini comme un des critères importants (rôle dans la protection) pour l'évaluation d'un potentiel vaccinal au stade pré-érythrocytaire. Nous avons étudié la sécrétion de IFN- $\gamma$  de cellules issues de 2 individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, car nous avons observé, lors de l'analyse d'autres antigènes, et en particulier de LSA3, un candidat vaccin étudié dans notre laboratoire (Daubersies et al., 2000), que le taux de sécrétion de cette cytokine semble être corrélé à la protection. Chez ces deux volontaires, le nombre de cellules sécrétant l'IFN- $\gamma$  contre DG747 et DG772 est aussi élevé que pour les recombinants issus de LSA3 (729 et PC), (figure 3.6a). De plus, nous avons examiné si les réponses immunes cellulaires mesurées par la prolifération de lymphocytes T et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  différaient entre deux chimpanzés immunisés avec les sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, mais dont un n'était pas protégé, (figure 3.6b et figure 4.3).

Les cellules du système immunitaire de l'animal immunisé avec les sporozoïtes irradiés viables (18 kRad) et ultérieurement protégé, ont reconnu les antigènes DG747 et DG772, ainsi que l'ont fait les cellules de l'animal immunisé avec des sporozoïtes irradiés non-viables (30 kRad), et pas protégé lors d'une infection d'épreuve.

Les proliférations lymphocytaires sont à la limite de la valeur seuil, tandis que les taux de sécrétion d'IFN- $\gamma$  sont élevés, aussi bien pour la quantité de cytokine détectée que pour le nombre de cellules sécrétrices (détecté par Elispot). Ceci est valable aussi bien pour les animaux efficacement immunisés et ceux n'étant pas protégés. Cependant, il semble que les taux de réponses sont plus élevés pour les animaux immunisés avec les sporozoïtes irradiés de 30 kRad. Les réponses induites par 747 sont plus fortes que celles qu'induit 772, et les deux plus fortes que celles induites par LSA3.

Les cellules prélevées sur des animaux ayant subi une immunisation supplémentaire par les sporozoïtes irradiés ont été endommagées lors du transport à partir du centre de primatologie en Afrique, et nous n'avons donc pas pu étudier la présence d'un « boost » induit contre ces antigènes.

#### 3.4.2. Étude des réponses humorales

Nous n'étions pas en possession des cellules de tous les groupes humains exposés de façon différente à l'infection parasitaire, mais nous avons pu étudier en détail la réponse humorale (isotypes d'IgG) de volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (ISS, seulement exposés aux stades pré-érythrocytaires), d'individus naturellement immuns vivant en zone de forte endémie (exposés à tous les stades du parasite), et d'un individu ayant été accidentellement infecté par le paludisme par transfusion sanguine, (uniquement exposé aux stades sanguins) (figure 3.7a et 3.7b).

Pour les deux antigènes, la différence la plus grande est observée pour l'isotype cytophile IgG1 dont le taux est beaucoup plus élevé dans le sérum d'individus immuns (SHI) que dans le sérum issu du malade infecté par transfusion ou de volontaires ISS. Les réponses de ces deux derniers groupes sont assez semblables et ne font pas apparaître de déséquilibre entre anticorps cytophiles (IgG1 et IgG3) et non cytophiles (IgG2 et IgG4). Nous avons en outre remarqué que le sérum issu d'un individu exposé longuement au parasite, mais sous prophylaxie permanente (le PM), a le même profil en isotypes que les ISS.



### 3.5. Immunogénicité chez la souris

Des souris de deux souches différentes ont été immunisées avec les recombinants sous formes de protéines, avec des adjuvants différents ou sous forme de constructions d'ADN « nu », sans adjuvant.

- 5 Une étude préliminaire avec une construction ADN nu ne comportant pas de séquence signal permettant l'exportation de la protéine synthétisée a été effectuée. Les souris immunisées n'ont généré aucune réponse humorale, que cela soit pour ces deux antigènes ou pour d'autres étudiés simultanément. Cependant, nous avons détecté des réponses cellulaires spécifiques anti-747 et
- 10 anti-772. Aussi bien les proliférations de lymphocytes T que le taux de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ont été testés pour deux souches de souris, la C3H et la BALB/c. Les profils de réponses sont présentés dans les tableaux 3.1a et 3.1b où l'on peut remarquer que pour le cas des réponses cellulaires de souris immunisées avec pNAK747, il y a aussi bien des stimulations de prolifération que de sécrétion
- 15 d'IFN- $\gamma$ , tandis que pour pNAK772, les proliférations des cellules T ont été très peu stimulées par rapport à la stimulation de sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui est considérable. Parmi toutes les souris immunisées, le niveau le plus élevé de sécrétions d'IFN- $\gamma$  est observé lorsque le niveau de stimulation de prolifération est le plus bas.
- 20 Les vaccinations par les autres formulations (protéine recombinante et ADN nu avec une séquence signal) ont toutes induit une réponse humorale chez les souris (figure 3.8). Tous les sérums issus de ces souris immunisées reconnaissent la protéine native en tests d'IFI et le marquage correspond avec celui observé pour les anticorps humains immunopurifiés.
- 25 Les réponses anti-747 présentent un profil similaire pour toutes les souris immunisées et toutes les formulations utilisées, avec une réponse isotypique à prépondérance IgG2b. Les réponses anti-772 sont aussi similaires entre souris et formulations de vaccins, mais avec une nette prédominance des IgG1. Le profil isotypique dépend donc de l'immunogène plus que du mode de présentation
- 30 utilisé. Cependant, les titres à point final sont beaucoup plus élevés lorsque l'on immunise avec des protéines recombinantes (1/200.000) par rapport à l'ADN

(1/2000), et les titres des sérums de souris immunisées avec His<sub>6</sub>-772 sont plus élevés que ceux des His<sub>6</sub>-747.

Puisque nous avons observé une réactivité croisée avec le stade sporozoïte de *P. yoelii*, nous avons testé le potentiel protecteur de ces antigènes par l'infection avec des sporozoïtes de cette espèce de souris immunisées avec les protéines recombinantes. La parasitémie a été suivie par l'observation des formes sanguines sur des frottis à partir du jour 3 de l'infection et pendant 12 jours consécutifs. Nous n'avons observé aucune protection quelle que soit la souche de souris utilisée, car la parasitémie a été détectée au même jour que celle des souris non immunisées, et la courbe était semblable à celle des souris témoins (résultats non-montrés).

### 3.6 Données supplémentaires

#### 3.6.1 DG772

Par RT-PCR sur l'ARN total issu de sporozoïtes et de parasites sanguins, les inventeurs ont pu déterminer les sites d'épissage de l'ARN messager correspondant au gène codant. La séquence des amorces a été extraite des données du génome de *Plasmodium falciparum*.

Les produits d'amplification sont de tailles identiques dans les stades sporozoïtes et les stades sanguins, et diffèrent de la taille du produit obtenu par amplification de l'ADN génomique et par séquençage les sites d'épissages se sont avérés d'être identiques (voir les introns indiqués dans la figure).

Le gène codant pour DG772 appartient à une famille de protéines identifiés par un motif partagé. Toutes les protéines de la famille des EBP (Erythrocyte Binding Proteins) partagent des motifs conservés de résidus cystéine dont l'agencement est similaire pour toutes les protéines. Cependant, le degré d'identité ne dépasse pas 31 % (max. 57 % d'homologie), même dans les régions les plus conservées.

#### 3.6.2 Tests d'immunogénicité envisagés dans les humains.

D'après nos résultats obtenus dans les souris, nous pouvons confirmer que les antigènes DG747 et DG772 employés aussi bien sous forme d'ADN que

sous forme de protéine recombinante sont immunogènes. De plus, du fait que les protéines recombinantes sont reconnues par des individus immunisés et protégés contre l'infection par des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* indiquerait un rôle de ces antigènes dans l'immunité pré-érythrocytaire. Un test dans des primates, et en particulier des chimpanzés va nous permettre des résultats préliminaires qui nous permettront de choisir la formulation optimale pour des tests cliniques chez l'humain.

Dans les essais de phase I, afin d'étudier l'immunogénicité et la sûreté du produit, nous envisageons trois formulations toutes préparées dans des conditions GMP: 1) l'antigène sous forme de protéine recombinante purifiée à partir de la bactérie *Lactococcus lactis* (utilisation permise dans les humains) adjuvée avec l'adjuvant SBAS2 (GSK) ; 2) la construction d'ADN dans le vecteur Vical™ (Avantis Pasteur) ; et 3) des lipopeptides synthétiques injectés sans aucun adjuvant (v. LSA3) . Ces formulations vont être distribuées par injection sous-cutanée (au niveau du deltoïde). Par des tests préliminaires, nous savons que les antigènes His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 induisent des réponses cellulaires et des réponses humorales chez des individus n'ayant été exposés uniquement aux stades pré-érythrocytaires. Nous allons ensuite étudier les réponses cellulaires et les réponses humorales des individus immunisés par les formulations choisies en les comparant avec celles observées dans des individus immunisés avec des sporozoïtes atténués par irradiation et protégés contre une infection d'épreuve avec des sporozoïtes non-atténués. En fonction de ces réponses, une infection d'épreuve avec des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* sera envisagée.

### 3.6.3 Homologie avec d'autres séquences nucléotidiques.

Une hybridation par Southern blot dans les conditions stringentes standard (0.1 X SSC, 60 °C) ne donnerait lieu à aucune autre hybridation qu'avec le gène correspondant.

### 3.6.4 Recherche d'homologie par des moyens bioinformatique

Les recherches ont été effectuées avec le logiciel BLAST (tblastx et blastn) sur toutes les bases de données disponibles du génome de *Plasmodium*

*falciparum* ainsi que les bases de données d'autres organismes. Les paramètres utilisées sont les paramètres de défaut trouvées sur les site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

### 5 3.7 Discussion

Ce travail qui fait partie de l'étude des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires nous a permis une première caractérisation et l'évaluation du potentiel vaccinal de deux nouveaux antigènes de *P. falciparum*. Ces deux antigènes ont des caractéristiques différentes au niveau moléculaire. D'une part, la protéine dont fait partie le DG747 contient des répétitions, tandis que la molécule contenant le DG772 n'a aucune répétition directe. Le gène Pfb0155c codant pour DG747 est petit (1524 bp) et contient une région répétitive à laquelle appartient DG747. Nous n'avons pas pu détecter la présence du gène par PCR dans toutes les souches, ni pu observer une réactivité avec toutes les souches de sporozoïtes étudiées. L'absence observée peut être due à une réelle délétion du gène ou aux procédures expérimentales. En effet, une des amorces utilisées pour la détection de la partie codante pour DG747 chevauche la partie répétitive, ce qui peut entraîner une difficulté à amplifier un gène contenant une répétition plus grande, ou à détecter un gène contenant moins de répétitions. De plus, ceci est aussi le cas pour la détection en immunofluorescence indirecte où un nombre éventuel de variations de répétitions peut changer l'affinité des anticorps spécifiques, si l'épitope cible chevauche cette région. L'expression détectée par IFI semble être présente tout au long du cycle parasitaire asexué dans l'hôte vertébré (nous n'avons pas analysé les stades sexuels). Malgré la présence de répétitions dans le DG747, nous n'avons pas détecté de réactivité croisée avec d'autres antigènes de *P. falciparum*. La séquence du gène entier n'a pas d'homologie avec d'autres protéines plasmodiales jusqu'ici identifiées, et nous n'avons pas encore d'indications sur une fonction biologique éventuelle.

Le DG772 ne contient pas de répétitions et sa présence semble être constante, qu'elle soit détectée par PCR ou par IFI. Au niveau biologique, le gène codant pour DG772 s'avère être intéressant. Nous avons trouvé par homologie de séquence que ce gène de 5300 bp de cadre de lecture ouverte fait partie de la

famille des EBP (Erythrocyte Binding Protein) (Adams et al., 1992), mais que la séquence de DG772 n'appartient pas aux régions conservées de cette famille, il ne partage qu'une petite partie de séquences avec l'extrémité N-terminale de la région 3'cys. D'ailleurs, il n'a pas de réactivités croisées ni d'homologie de séquence avec DG249, un autre clone faisant partie d'une des parties consensus du gène codant pour EBA-175. Il se peut que DG772 fasse partie d'une région qui confère une particularité à chaque molécule de cette famille. La présence de deux molécules de la famille d'EBP (EBA-175 et 772) sur les sporozoïtes pourrait impliquer qu'il existe plusieurs molécules de cette famille qui interviendraient de façon alternative dans le processus d'invasion comme décrit dans les stades sanguins.

Une connaissance de la prévalence est utile lors de l'évaluation d'un candidat vaccin, et les prévalences obtenues pour DG747 et DG772, de 85% et 75 %, sont importantes. Cette étude a montré l'antigénicité importante d'une petite partie des deux molécules, et a suggéré qu'il y aurait un intérêt à étudier plus en détail d'autres epitopes de la même molécule. La réponse humorale détectée contre DG747 et DG772 dans des individus exposés en permanence indique qu'il y a une prépondérance en réponse IgG1 (type cytophile) développée lors d'une exposition soutenue qui n'est pas retrouvée dans le cas de paludisme transfusionnel. Par contre, les profils de réponses humorales obtenus pour deux groupes exposés aux stades pré-érythrocytaires à plus ou moins longue durée (PM et ISS) se ressemblent, et le niveau d'IgG1 est bas, ce qui indique que cet isotype traduit l'exposition répétée de l'antigène aux stades sanguins. L'étude des réponses cellulaires dans ces mêmes zones devra être effectuée afin d'avoir une notion plus précise des réponses immunitaires induites par ces antigènes.

Aux stades pré-érythrocytaires, nous avons observé une induction de réponse cellulaire par ces antigènes aussi bien dans des chimpanzés que chez des humains. Nous avons observé la sécrétion IFN- $\gamma$ , décrit comme un facteur intervenant dans la protection contre les stades pré-érythrocytaires. La différence de réponse observée chez les chimpanzés en fonction de la dose d'irradiation pourrait signifier que les antigènes sont reconnus aussi bien sur les sporozoïtes que dans les stades hépatiques. En effet, les sporozoïtes irradiés à 30 kRad sont

incapables de pénétrer dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc seulement dues à cette exposition, tandis que les sporozoïtes irradiés à 18 kRad se développent dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc dues à ce stade. Il serait intéressant d'étudier de plus près les réponses induites dans ces deux animaux (restriction MHC1), et l'induction de « boost » de réponse lors de plusieurs immunisations successives. Ce travail a aussi montré que dans ces deux fragments d'antigènes, il existe aussi bien des épitopes T que des épitopes B.

L'immunogénicité induite par les deux antigènes dans la souris est différente avec une prédominance d'IgG1 pour le DG772, qui n'est pas observée pour DG747. Par contre, nous n'avons observé aucune différence dans les réponses en fonction des formulations, ce qui est intéressant car la présentation des molécules n'est pas identique pour chaque formulation. Les réponses cellulaires uniquement obtenues pour la formulation n'ayant pas induit de réponses humorales détectables montre qu'il y a eu aussi bien des proliférations de lymphocytes, que des sécrétions d'IFN- $\gamma$  en fonction des souris. Les sécrétions d'IFN- $\gamma$  ont tendance à être plus élevées lorsque les taux de prolifération sont bas, mais ceci reste à être étudié plus précisément avec un nombre plus élevé de souris. L'absence de protection des souris immunisées ne permet pas d'exclure une protection chez l'homme ou par infection avec *P. falciparum* car les épitopes cibles ne sont pas nécessairement les mêmes. Afin d'étudier un rôle dans l'interaction *P. falciparum*/hôte vertébré, nous avons à disposition un modèle *in vitro* avec des hépatocytes humains et des sporozoïtes de *P. falciparum* qui permettront l'étude de l'inhibition de l'invasion, et les études *in vivo* seront possibles dans un modèle de singes *Aotus/P. falciparum* qui se trouve en Colombie. Actuellement, nous sommes en train d'effectuer le travail nécessaire pour compléter les analyses entamées sur ces antigènes pour ce qui est de l'immunogénicité.

**Tableau D1:Récapitulatif des antigènes pré-érythrocytaires du paludisme connus à présent\*.**

Antigène	Références <sup>1</sup>	Stades d'expression <sup>2</sup>				Localisation <sup>3</sup>	Structures	
		S	H	SSA	SSS		Intron	Reps
CS	(Nardin et al., 1982)	+	j	-	-	CHR3	+	+
LSA1	(Guérin-Marchand et al., 1987)	+	j,m	-	-	CHR4	-	+
TRAP	(Robson et al., 1988)	+	j,m	m	-	CHR13	-	+
PfHsp70	(Renia et al., 1990)	+	j,m	j,m	-	CHR13		+
STARP	(Fidock et al., 1994)	+	j,m	-	-	CHR12	+	+
EXP-1	(Koenen et al., 1984), (Sanchez et al., 1994)	-	m	j,m	Nt	CHR12	-	+
Pfs16	(Bruce et al., 1990)	+	nt	-	+	?	-	-
SALSA	(Bottius et al., 1996)	+	j,m	-	-	CHR2	+	-
LSA3	(Daubersies et al., 2000)	+	j,m	-	-	CHR2	+	+
PIEMP3	(Pasloske et al., 1993), (Grüner et al., 2001)	+	j,m	j,m	-	CHR2	+	+
GLURP	(Borre et al., 1991)	+	m	j,m	Nt	CHR10	-	+
EBA-175	(Camus and Hadley, 1985)	+	j,m	j,m	-	CHR4,13 ?	+	-
DG747		+	j,m	j,m	-	CHR2	?	+
DG772		+	j,m	j,m	-	CHR1	+	-

\* Les antigènes en gris sont les antigènes caractérisés dans cette demande.

5 NT : Non testé

1 : La présence aux stades pré-érythrocytaires d'autres antigènes (MSP-1) a aussi été suggérée, mais les résultats préliminaires restent à confirmer. Les références soulignées indiquent l'année de découverte de l'expression pré-érythrocytaire.

2. S : sporozoïte ; H : Stade hépatique jeune et mûr ; SSA : Stade Sanguin asexué jeune et mûr ;

10 SSS : Stade sanguin sexué. 3. ST : sub-télomérique. Les caractères en gras indiquent la forme du stade où le marquage est le plus intense.

3. La plupart des localisations chromosomales a été faites par recherche d'homologie sur des bases de données

**Tableau 3.1a: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion  
d'IFN- $\gamma$  par His<sub>6</sub>-747 après 3 immunisations avec pNAK747.**

Souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His <sub>6</sub> -747	pGEX- NN	His <sub>6</sub> -747	pGEX- NN
C3H	<b>8.6 ± 3.0</b>	3.2 ± 1.1	7.0 ± 0.4	4.0 ± 0.9
C3H	<b>23.6 ± 5.9</b>	8.8 ± 2.9	7.0 ± 0.7	4.0 ± 0.2
C3H	3.0 ± 0.9	1.1 ± 0.1	<b>16.0 ± 1.9</b>	1.0 ± 2.1
Positifs	<b>2/3</b>	-	<b>1/3</b>	-
BALB/c	2.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	<b>40.0 ± 5.0</b>	24.0 ± 3.0
BALB/c	<b>23.6 ± 4.3</b>	3.0 ± 0.3	<b>15.0 ± 4.4</b>	8.0 ± 1.8
BALB/c	<b>33.7 ± 7.2</b>	5.9 ± 0.3	<b>16.0 ± 1.5</b>	10.0 ± 4.2
Positifs	<b>2/3</b>	-	<b>3/3</b>	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His<sub>6</sub>-747.

Les résultats positifs sont en gras.

5

**Tableau 3.1b: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion  
d'IFN- $\gamma$  par His<sub>6</sub>-772 après 3 immunisations avec pNAK772.**

souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His <sub>6</sub> -772	pGEX- NN	His <sub>6</sub> -772	pGEX- NN
C3H	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	<b>23.9 ± 2.0</b>	10.7 ± 2.9
C3H	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.7 ± 2.0	3.3 ± 2.1
C3H	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	6.6 ± 0.1	5.8 ± 2.6
Positifs	<b>0/3</b>	-	<b>1/3</b>	--
BALB/c	<b>3.5 ± 0.3</b>	2.7 ± 0.4	<b>24.0 ± 2.2</b>	10.8 ± 3.0
BALB/c	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	<b>31.3 ± 7.1</b>	5.6 ± 0.9
BALB/c	<b>3.2 ± 0.9</b>	1.5 ± 0.2	<b>25.0 ± 12.1</b>	6.9 ± 1.5
Positifs	<b>1/3</b>	-	<b>3/3</b>	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His<sub>6</sub>-772.

Les résultats positifs sont en gras

10



**Tableau 4.1: Réponses cellulaires de souris après 5 immunisations avec pNAK438\*.**

souris	Prolifération (I.S.)	Sécrétion d'IFN- $\gamma$	Anticorps
C3H	$2.3 \pm 0.3$	$2.2 \pm 2.0$	-
C3H	$1.8 \pm 1.1$	$15.6 \pm 4.0$	-
C3H	$3.2 \pm 1.3$	$0.5 \pm 0.2$	-
Positifs	2/3	1/3	
BALB/c	$4.3 \pm 1.6$	$26.2 \pm 6.3$	-
BALB/c	$5.3 \pm 0.6$	$29.3 \pm 8.5$	-
BALB/c	$15.3 \pm 2.2$	$12.7 \pm 8.7$	-
Positifs	3/3	3/3	

\* Les taux de réponses sont représentés par rapport aux réponses obtenues par une valeur seuil. La valeur seuil est calculée en faisant la moyenne des réponses d'animaux non-immunisés et celle des animaux immunisés contre un antigène non-relevant, comme l'OspC, une protéine de la *Borrelia burgdorferi*.

**Tableau 4.2: Détection d'expression par IFI avec des anticorps humains immunopurifiés ou des sérums de souris spécifiques anti-His<sub>6</sub>-680**

Parasites*	$\alpha$ -His <sub>6</sub> -680 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23	++/+++ (75%)
anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54	
anneaux/schizontes	

\* Les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* viennent de la souche NF54.

T23: souche de provenance thaï; NF54 souche d'origine africaine.

**Tableau 5.1: Réactivités croisées détectées en Western blots entre les membres de la famille Pf11-1**

	P43	P263	P322	P453	P525	P563	P571
E43							
E263							
E322							
E453							
E525							
E563							
E571							
E676f							
E571							

 Réaction forte  
 Réaction moyenne

E : anticorps immunopurifiés (élués) sur les protéines recombinantes correspondantes.

5 P : protéine recombinante.

**Tableau 5.2: Réactivités croisées au niveau nucléotidique entre les clones de la famille Pf11-1\***

clones PM	PCR571 (1)	sonde contrôle
43	+++	++
88	++	0
322	+++++	+++++
525	++++	+++++
563	++++	++++
571	+++++	+++++
676f	+++++	++++
729E	+++	+++++
263	++++	NT
381	++	NT
453	+++	NT

10 \* L'intensité du signal est symbolisé par des croix.

NT : non testé.

**Tableau 5.3 : Homologies de séquences des clones étudiés par BLAST**

Clone	Taille nucléotidique <sup>1</sup> (bp)	Répétitions acides aminés	Homologie  Nucléotides Protéines	Degré d'homologie avec 571 Nucléotides Protéines
DG43	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, <b>100%</b> (=88)	80%, <b>80%</b>
DG88	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, <b>100%</b> (=43)	Idem DG43
DG263-7	253	Non	<i>P. falciparum</i> Chr 12 95%, <b>60%</b>	-
DG263-8	176	Non	<i>P. f.</i> CHR12 95%, <b>45%</b> humain chr22 <b>58%</b>	-
DG322-1	<u>500</u>	-	-	-
DG322-2	<u>2000</u>	PeeVLEEVI	Pf11-1 86 %, <b>65%</b>	79% -
DG381	<u>400</u>	PEKlVEEVI	plastid tRNA 100%, <b>CHR2 71%</b>	-
DG453	<u>300</u>	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 2 88%, <b>83%</b>	<b>93%, 72%</b>
DG525	<u>450</u>	PeLeEEVI	GLURP R2 98%, <b>100%</b>	-
DG563	438	PIVEEwEE	Pf11-1 Part 4 : 86%, <b>Part 1 68%</b>	<b>75%, 56%,</b>
DG571	<u>550</u>	PEEIIIEIV	Pf11-1 Part 5 87 %, <b>55%</b>	<b>100 %, 100%</b>
DG676f	2000	PvVEEvLEE	Pf11.1 Part 488 %, <b>Part 5 75%</b>	<b>74%, 44%</b>
DG729E	<u>1.7</u>	-	mal3P5 100%	-

1 : Taille estimée par rapport aux produits PCR obtenus, ou la taille précise lorsque le clone entier a été séquencé.

**CHR** : Chromosome; part : partie

**Tableau 5.4: Réactivité en IFI testés avec des anticorps spécifiques aux His<sub>6</sub>-571 et Vi571**

Parasites	a-His <sub>6</sub> -571, aVi571 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

**Tableau 5.5: Réponses cellulaires des souris immunisées avec pNAK571**

souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	571 pGEX	NNpGEX	571 pGEX	NNpGEX
C3H morte	$0.9 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.05$	$31.0 \pm 2.5$	$21.21 \pm 10.6$
C3H	$0.9 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.1$	<b><math>30.2 \pm 2.6</math></b>	$10.50 \pm 2.03$
C3H	$0.8 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.2$	<b><math>16.8 \pm 0.1</math></b>	$6.65 \pm 2.8$
Positifs	<b>0/3</b>	-	<b>2/3</b>	-
BALB/c	<b><math>3.5 \pm 0.3</math></b>	$2.7 \pm 0.13$	<b><math>23.1 \pm 0.9</math></b>	$10.36 \pm 2.2$
BALB/c	$1.9 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.1$	<b><math>15.9 \pm 2.1</math></b>	$8.63 \pm 3.9$
BALB/c (morte)	<b><math>3.2 \pm 0.9</math></b>	$1.5 \pm 0.1$	<b><math>5.3 \pm 1.3</math></b>	$1.06 \pm 0.5$
Positifs	<b>2/3</b>	-	<b>3/3</b>	-

NNpGEX : recombinant de fusion GST de LSA3 non relevant.

5

Bien que la présente invention ait été décrite par rapport aux réalisations concrètes et privilégiée, il apparaîtra toutefois évident aux personnes versées dans l'art ou la science en cause qu'il est possible d'introduire un certains nombres de variations et modifications sans déroger à la portée de l'invention

10 décrite dans ce document.

**REVENDICATIONS:**

1. Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique ayant au moins 60 %, préférablement au moins 80% et plus  
5 préférablement au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO: 1 (DG747) ou la SEQ ID NO: 2 (DG772).
2. Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 10  
10 nucléotides consécutifs identiques à la SEQ ID NO: 1 ou la SEQ ID NO: 2.
3. Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2.
- 15 4. Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il est codé par un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 60 %, préférablement au moins 80% et plus préférablement au moins 95% d'homologie  
20 avec la SEQ ID NO: 3 (DG747) ou la SEQ ID NO: 4 (DG772).
6. Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 acide aminés consécutifs identiques à l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 7, et la SEQ ID NO: 8.  
25
7. Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 40% d'identité avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 6.
8. Polypeptide recombinant ou chimérique caractérisé en ce qu'il comprend  
30 au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 7.

9. Antigène caractérisé en ce qu'il consiste en un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou en un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 8.
- 5 10. Conjugué antigénique constitué de polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et/ou de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8; et d'un support sur lequel lesdits polynucléotides/polypeptides sont adsorbés.
- 10 11. Conjugué selon la revendication 10 caractérisé en ce que le support est constitué de microsphères, de microparticules de billes de latex, de polyphosphoglycans (PGLA) ou de polystyrène.
12. Utilisation d'un conjugué selon la revendications 10 ou 11, pour  
15 l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.
13. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux purifiés reconnaissants spécifiquement au moins une des polynucléotides, polypeptides et/ou conjugués  
20 définis aux revendications 1 à 11.
14. Anticorps selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'ils sont humanisés.
- 25 15. Vecteur de clonage ou d'expression comprenant une séquence polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
16. Un vecteur selon la revendication 15, dans lequel la dite séquence est incorporé dans un des sites non essentiel à la réplication dudit vecteur.
- 30 17. Un vecteur selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ledit vecteur est choisi parmi les plasmides, les cosmides ou les phages.

18. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.
- 5 19. Cellule E.Coli recombinante choisie parmi les cellules déposées à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accèsion I-2671 et I-2672.
20. Composition immunogène comprenant:
- 10 - au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; et
- au moins un véhicule pharmaceutique acceptable.
- 15 21. Composition immunogène selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS<sub>2</sub> et l'adjuvant incomplet de Freund.
22. Composition immunogène selon la revendication 20 ou 21, caractérisée en
- 20 la molécule polypeptidique est adsorbé sur des microparticules.
23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans laquelle ladite molécule polynucléotidique est sous forme d'ADN.
- 25 24. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.
- 30 25. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse cellulaire et/ou humorale *in vivo* et/ou *in vitro*.



26. Composition immunogène selon les revendications 24 ou 25, caractérisée en ce qu'elle permet la production d'interféron- $\gamma$  par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés.

5

27. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 24 à 26, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention d'une réponse humorale IgG.

10 28. Composition immunogène selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse humorale de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

15 29. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 28, caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire, *in vivo* et *in vitro*, une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*.

30. Vaccin anti-palustre comprenant:

- 20 - au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; et
- au moins un véhicule pharmaceutique acceptable.

25 31. Vaccin selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

30 32. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 13 ou 14, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

33. Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS<sub>2</sub> et l'adjuvant incomplet de Freund.

5

34. Utilisation d'au moins un des éléments suivants: polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, conjugués selon la revendication 10 ou 11; anticorps selon la revendication 13 ou 14; pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.

10

35. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un anticorps selon la revendication 13 ou 14 afin de permettre la formation de complexes immuns; et

15

b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

20

36. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins une desdites conjugués et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et

25

30

b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

37. Méthode selon la revendication 35, caractérisée en ce qu'à l'étape a), le tissu et/ou le fluide biologique est de plus mis en contact avec au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3,  
 5 LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.

38. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments suivants :

- a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les  
 10 polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; les  
 polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, les conjugués  
 selon la revendication 10 ou 11;
- b) des réactifs pour la constitution du milieu propice à une réaction de liaison  
 entre un échantillon à tester et au moins une des molécules définies en a); et
- 15 c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps  
 produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter  
 un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif  
 marqué.

20 39. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments  
 suivants :

- des anticorps selon la revendication 13 ou 14;
- des réactifs pour la constitution du milieu propice à une réaction de  
 liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- 25 - des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps  
 produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également  
 porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par  
 un réactif marqué.

30 40. Le kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme selon la revendication 38,  
 caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins une molécule peptidique

58

choisie dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

41. Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon l'une quelconque des  
5 revendications 38 à 40, caractérisé en ce qu'il comprend également l'adjuvant  
SBAS2.

59

**FIGURE 1A: SEQ ID NO 1 (DG747) Format BLASTA**

1 GAATTCCATA TGCACGATTA CATATATGAT GATCGTATCT ACAATAATGA TAAAGAGAAA  
 61 AATGTTATAA AAAGTGATAA TAAAAATGTT ATAAAAAGTG ATAATAAAAA TGATTATAAA  
 121 AAGTGTAAATA AAAATGTTAT AAAAAGTGAT AATAAAAAATG TTATAAAAAG TGATAATAAA  
 5 181 AATGTGGAAT TC

**FIGURE 1B: SEQ ID NO 2 (DG772) Format BLASTA**

1 GAATTCCCAG ATCCTCGAAG TAATGACCAA GAAGATGCTA CTGACGATGT TG TAGAAAAT  
 10 61 AGTAGAGATG ATAATAATAG TCTCTCTAAT AGCGTAGATA ATCAAAGTAA TGTTTAAAT  
 121 AGAGAAGATC CTATTGCTTC TGAAACTGAA GTTGTAAGTG AACCTGAGGA TTCAAGTAGG  
 181 ATAATGACTA CAGAAGTTCC AAGTACTACT GTAAAACCCC CTGATGAAAA ACGATCTGAA  
 241 GAAGTAGGAG AAAAAGAAGC TAAAGAAATT AAAGTAGAAC CTGTTGTACC AAGAGCCATT  
 301 GGAGAACCAA TGGAAAATTC TGTGAGCGTA CAGTCCCCTC CTAAGGAATT C  
 15

**FIGURE 1C: SEQ ID NO 3 (DG747) Format BLASTA**

1 EFHMHDIYD DRIYNNQKEK NVIKSDNKNV IKSDNKNDYK KCNKNVIKSD NKNVIKSDNK  
 61 NVEF  
 20

**FIGURE 1D: SEQ ID NO 4 (DG772) Format BLASTA**

1 EFPDPRSNDQ EDATDDVVEN SRDNNNSLSN SVDNQSNVLN REDPIASETE VVSEPEDSSR  
 61 IMTTEVPSTT VKPPDEKRSE EVGEKEAKEI KVEPVVPRAI GEPMENSVSQ QSPPKF  
 25

**FIGURE 1E: SEQ ID NOs 5-8:**

SEQ ID NO 5: DNKNV  
 SEQ ID NO 6: DNKND  
 SEQ ID NO 7: DKEKNV  
 30 SEQ ID NO 8: KSDNKNV



[illegible]

62

	710	720	730	740	750	760	770	780
	AAGAAAAATATAGCCAATGAAAATATAAAAGAAGGAAAGAGTTCAATTTATAATGATGAACATAATTATAATTCATTA							
	<u>K K N I A N E N I K E G K S S I Y N D E H N Y N S L</u>							
5	R K I . P M K I . K K E R V Q F I M M N I I I I H Y							
	E K Y S Q . K Y K R R K E F N L . . . T . L . F I I							
	790	800	810	820	830	840	850	
10	TTATATAATTCTTGTAATGGTGAAATAAGTAAGATCAACAAAATAAGTAGTCATAATAATATTGATAATAATATGGAT							
	<u>L Y N S C N G E I S K I N K I S S H N N I D N N M D</u>							
	Y I I L V M V K . V R S T K . V V I I I I L I I I W I							
	I . F L . W . N K . D Q Q N K . S . . Y . . . Y G .							
15	860	870	880	890	900	910	920	930
	AATTATAATACGTTTGCAAATGTGAATAATTTTATAATATATTCCTCAGATGATGAAGATAATATATCAAATTATTAT							
	<u>N Y N T F A N V N N F I I Y S S D D E D N I S N Y Y</u>							
	I I I R L Q M . I I L . Y I P Q M M K I I Y Q I I I							
20	L . Y V C K C E . F Y N I F L R . . R . Y I K L L .							
	940	950	960	970	980	990	1000	1010
	AATGGTAAAGACGTATTAAATGATGAGATTATGTTCCCTATAAAATTTAATTTTGAAAAATTAATAAAAAATATTTAT							
25	<u>N G K D V L N D E I M F P I K F N F E K L K K N I Y</u>							
	M V K T Y . M M R L C S L . N L I L K N . K K I F M							
	W . R R I K . . D Y V P Y K I . F . K I K K K Y L C							



63

	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
	GTAATAGAGCATATAGACAAAATATATTATGATACATTTTTAAATAAAAAATCCAAGTGAAAAAAGTGTTTTTATGAAT							
	<u>V I E H I D K I Y Y D T F L N K N P S E K S V F M N</u>							
5	• • S I • T K Y I M I H F • I K I Q V K K V F L • M							
	N R A Y R Q N I L • Y I F K • K S K • K K C F Y E •							
	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
10	GATGAATCTACTGGTTATTTGAAAAATGATGTGAATGACAAATGTGTTGTTGATAATATAAATGTTATTAATCCTTCT							
	<u>D E S T G Y L K N D V N D K C V V D N I N V I N P S</u>							
	M N L L V I • K M M • M T N V L L I I • M L L I L L							
	• I Y W L F E K • C E • Q M C C • • Y K C Y • S F •							
15	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	
	AGTGTGAATACGTTGAGTAATATTTCAAATATTAGGAATGAAAAATAGAAAATAATAAGAATGAAAAATTAATA							
	<u>S V N T L S N I S N I R N E K I E N N N K N E K L I</u>							
	V • I R • V I F Q I L G M K K • K I I I R M K N • •							
20	C E Y V E • Y F K Y • E • K N R K • • • E • K I N K							
	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	AAATCATATCCTACACAATCAAAAAATGTTATGAGTACATTTTCCTTTTGAATATTGAAAAGGAGACATTTATAACA							
25	<u>K S Y P T Q S K N V M S T F S F W N I E K E T F I T</u>							
	N H I L H N Q K M L • V H F P F G I L K R R H L • Q							
	I I S Y T I K K C Y E Y I F L L E Y • K G D I Y N K							
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
30	AAACCTTTGTATGCACAAAATTTGAGAAAAACAATTTAGTTTATTAGATGAATCTGAAGAGATGATAAGAAATTAT							
	<u>K P L Y A Q N L R K K Q F S L L D E S E E M I R N Y</u>							
	N L C M H K I • E K N N L V Y • M N L K R • • E I I							
35	T F V C T K F E K K T I • F I R • I • R D D K K L F							

64

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
	TCATCTAATCAATATTCTATAAAATTTGTACCAAGACATTTATTATATGTAATGAGTCAAGTTGCTTCTCGATCCTTT							
	<u>S S N Q Y S I K F V P R H L L Y V M S Q V A S R S F</u>							
5	H L I N I L • N L Y Q D I Y Y M • • V K L L L D P F							
	I • S I F Y K I C T K T F I I C N E S S C F S I L F							

	1490	1500	1510	1520
10	TTTGATCCTTTATATAGAAAGCAGTTATTTTTTCGTTACTAA			
	<u>F D P L Y R K Q L F F R Y •</u>			
	L I L Y I E S S Y F F V T			
	• S F I • K A V I F S L L			

65

**Figure 2B: Gène codant pour DG772 extrait de la base des données génome  
de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum***

En gris (■), la séquence correspondant au clone DG772. La différence avec la séquence issue de la souche T9.96 (position 3612) est montrée en gras dans la séquence.

```

5
      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
ATGAAAGGGAAAATGAATATGTGTTTGTCTTTTCTATTCTATATTATATGTTGTATTATGTACCTATGTATTAGGT
M K G K M N M C L F F F Y S I L Y V V L C T Y V L G
10  • K G K • I C V C F F S I L Y Y M L Y Y V P M Y • V
    E R E N E Y V F V F F L F Y I I C C I M Y L C I R Y

      80      90      100      110      120      130      140      150
      |      |      |      |      |      |      |      |
15  ATAAGTGAAGAGTATTTGAAGGAAAGGCCCAAGGTTTAAATGTTGAGACTAATAATAATAATAATAATAATAAT
I S E E Y L K E R P Q G L N V E T N N N N N N N N N N
    • V K S I • R K G P K V • M L R L I I I I I I I I I I
    K • R V F E G K A P R F K C • D • • • • • • • • • •

20      160      170      180      190      200      210      220      230
      |      |      |      |      |      |      |      |
AATAATAGTAATAGTAACGATGCGATGTCTTTTGTAATGAAGTAATAAGGTTTATAGAAAACGAGAAGGATGATAAA
N N S N S N D A M S F V N E V I R F I E N E K D D K
    I I V I V T M R C L L • M K • • G L • K T R R M I K
25  • • • • • R C D V F C K • S N K V Y R K R E G • • R

      240      250      260      270      280      290      300      310
      |      |      |      |      |      |      |      |
GAAGATAAAAAAGTGAAGATAATATCTAGACCTGTTGAGAATACATTACATAGATATCCAGTTAGTTCTTTTCTGAAT
30  E D K K V K I I S R P V E N T L H R Y P V S S F L N
    K I K K • R • Y L D L L R I H Y I D I Q L V L F • I
    R • K S E D N I • T C • E Y I T • I S S • F F S E Y

```

66

320 330 340 350 360 370 380 390  
 | | | | | | | |  
 ATCAAAAAGTATGGTAGGAAAGGGAATATTTGAATAGAAATAGTTTTGTTCAAAGATCATATATAAGGGGTTGTAAA  
 I K K Y G R K G E Y L N R N S F V Q R S Y I R G C K  
 5 S K S M V G K G N I • I E I V L F K D H I • G V V K  
 Q K V W • E R G I F E • K • F C S K I I Y K G L • R

400 410 420 430 440 450 460  
 | | | | | | | |  
 10 GGAAAAAGAAGCACACATACATGGATATGTGAAAATAAAGGGAATAATAATATATGTATTCCTGATAGACGTGTACAA  
 G K R S T H T W I C E N K G N N N I C I P D R R V Q  
 E K E A H I H G Y V K I K G I I I Y V F L I D V Y N  
 K K K H T Y M D M • K • R E • • Y M Y S • • T C T I

15 470 480 490 500 510 520 530 540  
 | | | | | | | |  
 TTATGTATAACAGCTCTTCAAGATTTAAAAAATTCAGGATCTGAAACGACTGATAGAAAATTATTAAGAGATAAAGTA  
 L C I T A L Q D L K N S G S E T T D R K L L R D K V  
 Y V • Q L F K I • K I Q D L K R L I E N Y • E I K Y  
 20 M Y N S S S R F K K F R I • N D • • K I I K R • S I

550 560 570 580 590 600 610 620  
 | | | | | | | |  
 TTTGATTCAGCTATGTATGAAACTGATTGTTATGGAATAAATATGGTTTTCGTGGATTGATGATTTTTGTGACGAT  
 25 F D S A M Y E T D L L W N K Y G F R G F D D F C D D  
 L I Q L C M K L I C Y G I N M V F V D L M I F V T M  
 • F S Y V • N • F V M E • I W F S W I • • F L • R C

630 640 650 660 670 680 690 700  
 | | | | | | | |  
 30 GTAAAAATAGTTATTTAGATTATAAAGATGTTATATTTGGAACCGATTAGATAAAAAATAATATATCAAAGTTAGTA  
 V K N S Y L D Y K D V I F G T D L D K N N I S K L V  
 • K I V I • I I K M L Y L E P I • I K I I Y Q S • •  
 K K • L F R L • R C Y I W N R F R • K • Y I K V S R  
 35

67

	710	720	730	740	750	760	770	780
	GAGGAATCATTAAACGTTTTTTTAAAAAGATAGTAGTGTACTTAATCCTACTGCTTGGTGGAGAAGGTATGGAACA							
	<u>E E S L K R F F K K D S S V L N P T A W W R R Y G T</u>							
5	R N H • N V F L K K I V V Y L I L L L G G E G M E Q							
	G I I K T F F • K R • • C T • S Y C L V E K V W N K							
	790	800	810	820	830	840	850	
10	AGACTATGGAAACTATGATACAGCCATATGCTCATTAGGATGTAGAAAACCTGATGAGAATGAACCTCAGATAAAT							
	<u>R L W K T M I Q P Y A H L G C R K P D E N E P Q I N</u>							
	D Y G K L • Y S H M L I • D V E N L M R M N L R • I							
	T M E N Y D T A I C S F R M • K T • • E • T S D K •							
15	860	870	880	890	900	910	920	930
	AGATGGATTCTGGAATGGGGGAAATATAATTGTAGATTAATGAAGGAGAAAGAAAATTGTTAACAGGAGAATGTTCT							
	<u>R W I L E W G K Y N C R L M K E K E K L L T G E C S</u>							
	D G F W N G G N I I V D • • R R K K N C • Q E N V L							
20	M D S G M G E I • L • I N E G E R K I V N R R M F C							
	940	950	960	970	980	990	1000	1010
	GTTAATAGAAAAAATCTGACTGCTCAACCGGATGTAATAATGAGTGTATACCTATAGGAGTCTTATTAATAGACAA							
25	<u>V N R K K S D C S T G C N N E C Y T Y R S L I N R Q</u>							
	L I E K N L T A Q P D V I M S V I P I G V L L I D K							
	• • K K I • L L N R M • • • V L Y L • E S Y • • T K							
	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
30	AGATATGAGGTCTCTATATTAGGAAAAAATATATTAAAGTAGTACGATATACTATATTTAGGAGAAAAATAGTTCAA							
	<u>R Y E V S I L G K K Y I K V V R Y T I F R R K I V Q</u>							
	D M R S L Y • E K N I L K • Y D I L Y L G E K • F N							
	I • G L Y I R K K I Y • S S T I Y Y I • E K N S S T							
35								

68

	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
	CCTGATAATGCTTTGGATTTTTTAAATTAATTTGTTCTGAGTGTAAGGATATTGATTTTAAACCCTTTTTTGAATTT							
	<u>P D N A L D F L K L N C S E C K D I D F K P F F E F</u>							
5	L I M L W I F • N • I V L S V R I L I L N P F L N L							
	• • C F G F F K I K L F • V • G Y • F • T L F • I •							
	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	
10	GAATATGGTAAATATGAAGAAAAATGTATGTGTCAATCATATATTGATTTAAAAATCCAATTTAAAAATAATGATATT							
	<u>E Y G K Y E E K C M C Q S Y I D L K I Q F K N N D I</u>							
	N M V N M K K N V C V N H I L I • K S N L K I M I F							
	I W • I • R K M Y V S I I Y • F K N P I • K • • Y L							
15	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	TGTTCAATTAATGCTCAAACAGATACTGTTTCTAGCGATAAAAGATTTTGTCTTGAAAAGAAAGAATTTAAACCATGG							
	<u>C S F N A Q T D T V S S D K R F C L E K K E F K P W</u>							
	V H L M L K Q I L F L A I K D F V L K R K N L N H G							
20	F I • C S N R Y C F • R • K I L S • K E R I • T M E							
	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
	AAATGTGATAAAAATTCTTTTGAAACAGTTCATCATAAAGGTGTATGTGTGTCACCGAGAAGACAAGGTTTTTGTTTA							
25	<u>K C D K N S F E T V H H K G V C V S P R R Q G F C L</u>							
	N V I K I L L K Q F I I K V Y V C H R E D K V F V •							
	M • • K F F • N S S S • R C M C V T E K T R F L F R							
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
30	GGAAATTTGAATCTACTGAATGATGATATTTATAATGTACATAATTCACAACTACTTATCGAAATTATAATGGCT							
	<u>G N L N Y L L N D D I Y N V H N S Q L L I E I I M A</u>							
	E I • T I Y • M M I F I M Y I I H N Y L S K L • W L							
	K F E L S T E • • Y L • C T • F T T T Y R N Y N G F							
35								

69

1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
| | | | | | |  
TCTAAACAAGAAGGAAAGTTATTATGGAAAAACATGGAACAATACTTGATAACCAGAATGCATGCAAATATATAAAT  
S K Q E G K L L W K K H G T I L D N Q N A C K Y I N  
5 L N K K E S Y Y G K N M E Q Y L I T R M H A N I • M  
• T R R K V I M E K T W N N T • • P E C M Q I Y K •

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630  
| | | | | | |  
10 GATAGTTATGTTGATTATAAAGATATAGTTATTGGAAATGATTTATGGAATGATAACAACTCTATAAAAGTTCAAAAT  
D S Y V D Y K D I V I G N D L W N D N N S I K V Q N  
I V M L I I K I • L L E M I Y G M I T T L • K F K I  
• L C • L • R Y S Y W K • F M E • • Q L Y K S S K •

1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710  
| | | | | | |  
15 AATTTAAATTTAATTTTTGAAAGAAATTTGGTTATAAAGTTGGAAGAAATAAACTCTTTAAAACAATTAAAGAATTA  
N L N L I F E R N F G Y K V G R N K L F K T I K E L  
I • I • F L K E I L V I K L E E I N S L K Q L K N •  
20 F K F N F • K K F W L • S W K K • T L • N N • R I K

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790  
| | | | | | |  
25 AAAAATGTATGGTGGATATTAAATAGAAATAAAGTATGGGAATCAATGAGATGTGGAATTGACGAAGTAGATCAACGT  
K N V W W I L N R N K V W E S M R C G I D E V D Q R  
K M Y G G Y • I E I K Y G N Q • D V E L T K • I N V  
K C M V D I K • K • S M G I N E M W N • R S R S T •

1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870  
| | | | | | |  
30 AGAAAACTTGTGAAAGAATAGATGAACTAGAAAACATGCCACAATTCTTTAGATGGTTTTACAATGGGCACATTTTC  
R K T C E R I D E L E N M P Q F F R W F S Q W A H F  
E K L V K E • M N • K T C H N S L D G F H N G H I S  
K N L • K N R • T R K H A T I L • M V F T M G T F L  
35

70

	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
	TTTTGTAAGGAAAAAGAATATTGGGAATTAAAATTAAATGATAAATGTACAGGTAATAATGGAAAATCCTTATGTCAG							
	<u>F C K E K E Y W E L K L N D K C T G N N G K S L C Q</u>							
5	F V R K K N I G N • N • M I N V Q V I M E N P Y V R							
	L • G K R I L G I K I K • • M Y R • • W K I L M S G							
	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	
10	GATAAAACATGTCAAAATGTGTGTACTAATATGAATTATTGGACATATACTAGAAAATTAGCTTATGAAATACAATCC							
	<u>D K T C Q N V C T N M N Y W T Y T R K L A Y E I Q S</u>							
	I K H V K M C V L I • I I G H I L E N • L M K Y N P							
	• N M S K C V Y • Y E L L D I Y • K I S L • N T I R							
15	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	GTAAAATATGATAAAGATAGAAAATTATTTAGTCTTGCTAAAGACAAAAATGTAACACTACATTTTTAAAGGAAAATGCA							
	<u>V K Y D K D R K L F S L A K D K N V T T F L K E N A</u>							
	• N M I K I E N Y L V L L K T K M • L H F • R K M Q							
20	K I • • R • K I I • S C • R Q K C N Y I F K G K C K							
	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180
	AAAAATTGTTCTAATATAGATTTTACAAAAATATTCGATCAGCTTGACAAACTCTTTAAGGAAAGATGTTTCATGTATG							
25	<u>K N C S N I D F T K I F D Q L D K L F K E R C S C M</u>							
	K I V L I • I L Q K Y S I S L T N S L R K D V H V W							
	K L F • Y R F Y K N I R S A • Q T L • G K M F M Y G							
	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260
30	GATACACAAGTTTTAGAAGTAAAAAACAAAGAAATGTTATCTATAGACTCAAATAGTGAAGATGCGACAGATATAAGT							
	<u>D T Q V L E V K N K E M L S I D S N S E D A T D I S</u>							
	I H K F • K • K T K K C Y L • T Q I V K M R Q I • V							
	Y T S F R S K K Q R N V I Y R L K • • R C D R Y K •							

35



71

	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	GAGAAAAATGGAGAGGAAGAATTATATGTAAATCACAATTCTGTGAGTGTGCGCAAGTGGTAATAAAGAAATCGAAAAG							
	<u>E K N G E E E L Y V N H N S V S V A S G N K E I E K</u>							
5	R K M E R K N Y M • I T I L • V S Q V V I K K S K R							
	E K W R G R I I C K S Q F C E C R K W • • R N R K E							
	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	
10	AGTAAGGATGAAAAGCAACCTGAAAAAGAAGCAAAACAACTAATGGAACTTTAACCGTACGAACTGACAAAGATTCA							
	<u>S K D E K Q P E K E A K Q T N G T L T V R T D K D S</u>							
	V R M K S N L K K K Q N K L M E L • P Y E L T K I Q							
	• G • K A T • K R S K T N • W N F N R T N • Q R F R							
	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490
	GATAGAAACAAAGGAAAAGATACAGCTACTGATACAAAAAATTCACCTGAAAATTTAAAGTACAGGAACATGGAACA							
	<u>D R N K G K D T A T D T K N S P E N L K V Q E H G T</u>							
	I E T K E K I Q L L I Q K I H L K I • K Y R N M E Q							
20	• K Q R K R Y S Y • Y K K F T • K F K S T G T W N K							
	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570
	AATGGAGAAACAATAAAAGAAGAACCACCAAATTACCTGAATCATCTGAAACATTACAATCACAAGAACAATTAGAA							
25	<u>N G E T I K E E P P K L P E S S E T L Q S Q E Q L E</u>							
	M E K Q • K K N H Q N Y L N H L K H Y N H K N N • K							
	W R N N K R R T T K I T • I I • N I T I T R T I R S							
	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650
30	GCAGAAGCACAAAAACAAAAACAAGAAGAAGCAAAAAAAAAACAAGAAGAAGCAAAAAAAAAACAAGAAGAA							
	<u>A E A Q K Q K Q E E E P K K K Q E E E P K K K Q E E</u>							
	Q K H K N K N K K K N Q K K N K K K N Q K K N K K K							
	R S T K T K T R R R T K K K T R R R T K K K T R R R							
35								

72

2660      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730  
 |           |           |           |           |           |           |  
 GAACAAAACGAGAACAAGAACAACAAAACAAGAACAAGAACAACAAAACAAGAAGAACAACAATACAA  
E Q K R E Q E Q K Q E Q E E E E Q K Q E E E Q Q I Q  
 5    N K N E N K N K N K N K K K K N K N K K K N N K Y K  
      T K T R T R T K T R T R R R R T K T R R R T T N T R

2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800  
 |           |           |           |           |           |           |  
 10    GATCAATCACAAAGTGGATTAGATCAATCCTCAAAAGTAGGAGTAGCGAGTGAACAAAATGAAATTTCTTCAGGACAA  
D Q S Q S G L D Q S S K V G V A S E Q N E I S S G Q  
      I N H K V D • I N P Q K • E • R V N K M K F L Q D K  
      S I T K W I R S I L K S R S S E • T K • N F F R T R

2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880  
 |           |           |           |           |           |           |  
 15    GAACAAAACGTAAAAAGCTCTTCACCTGAAGTAGTTCACAAGAAACAACACTAGTGAAAATGGGTCATCACAAGACACA  
E Q N V K S S S P E V V P Q E T T S E N G S S Q D T  
      N K T • K A L H L K • F H K K Q L V K M G H H K T Q  
 20    T K R K K L F T • S S S T R N N • • K W V I T R H K

2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960  
 |           |           |           |           |           |           |  
 25    AAAATATCAAGTACTGAACCAAATGAGAATTCTGTTGTAGATAGAGCAACAGATAGTATGAATTTAGATCCTGAAAAG  
K I S S T E P N E N S V V D R A T D S M N L D P E K  
      K Y Q V L N Q M R I L L • I E Q Q I V • I • I L K R  
      N I K Y • T K • E F C C R • S N R • Y E F R S • K G

2970      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040  
 |           |           |           |           |           |           |  
 30    GTTCATAATGAAAATATGAGTGATCCAAATACAAATACTGAACCAGATGCATCTTTAAAAGATGATAAGAAGGAAGTT  
V H N E N M S D P N T N T E P D A S L K D D K K E V  
      F I M K I • V I Q I Q I L N Q M H L • K M I R R K L  
      S • • K Y E • S K Y K Y • T R C I F K R • • E G S •

35

73

3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120  
| | | | | | | |  
GATGATGCCAAAAAAGAACTTCAATCTACTGTATCAAGAATTGAATCTAATGAACAGGACGTTCAAAGTACACCACCC  
D D A K K E L Q S T V S R I E S N E Q D V Q S T P P  
5 M M P K K N F N L L Y Q E L N L M N R T F K V H H P  
• C Q K R T S I Y C I K N • I • • T G R S K Y T T R

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190  
| | | | | | | |  
10 GAAGATACTCCTACTGTTGAAGGAAAAGTAGGAGATAAAGCAGAAATGTTAACTTCTCCGCATGCGACAGATAATTCT  
E D T P T V E G K V G D K A E M L T S P H A T D N S  
K I L L L L K E K • E I K Q K C • L L R M R Q I I L  
R Y S Y C • R K S R R • S R N V N F S A C D R • F •

3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270  
| | | | | | | |  
15 GAGTCGGAATCAGGTTTAAATCCAACCTGATGACATTAACAACCTGATGGTGTGTTAAAGAACAAGAAATATTAGGG  
E S E S G L N P T D D I K T T D G V V K E Q E I L G  
S R N Q V • I Q L M T L K Q L M V L L K N K K Y • G  
20 V G I R F K S N • • H • N N • W C C • R T R N I R G

3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350  
| | | | | | | |  
25 GGAGGTGAAAGTGCAACTGAAACATCAAAAAGTAATTTAGAAAAACCTAAGGATGTTGAACCTTCTCATGAAATATCT  
G G E S A T E T S K S N L E K P K D V E P S H E I S  
E V K V Q L K H Q K V I • K N L R M L N L L M K Y L  
R • K C N • N I K K • F R K T • G C • T F S • N I •

3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430  
| | | | | | | |  
30 GAACCTGTTCTTTCTGGTACAACCTGGTAAAGAAGAATCAGAGTTATTAAGAAAGTAAATCGATAGAGACGAAGGGGGAA  
E P V L S G T T G K E E S E L L K S K S I E T K G E  
N L F F L V Q L V K K N Q S Y • K V N R • R R R G K  
T C S F W Y N W • R R I R V I K K • I D R D E G G N  
35

3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 5 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 10 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 15 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 20 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 25 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 [REDACTED]  
 30 [REDACTED] 3770 3780 3790 3800 3810 3820  
 [REDACTED] | | | | | |  
 [REDACTED] TAATGTAGAAGATGTTGAAAAAGAAACATTGATATCTGAGAATAATGGATTACAT  
 [REDACTED] N V E D V E K E T L I S E N N G L H  
 [REDACTED] M • K M L K K K H • Y L R I M D Y I  
 [REDACTED] • C R R C • K R N I D I • E • W I T •  
 35

75

3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900  
 | | | | | | |  
 AATGATACACACAGAGGAAATATCAGTGAAAAGGATTTAATCGATATTCATTTGTTAAGAAATGAAGCGGGTAGTACA  
N D T H R G N I S E K D L I D I H L L R N E A G S T  
 5 M I H T E E I S V K R I • S I F I C • E M K R V V Q  
 • Y T Q R K Y Q • K G F N R Y S F V K K • S G • Y N

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970  
 | | | | | | |  
 10 ATATTAGATGATTCTAGAAGAAATGGAGAAATGACAGAAGGTAGCGAAAGTGATGTTGGAGAATTACAAGAACATAAT  
I L D D S R R N G E M T E G S E S D V G E L Q E H N  
 Y • M I L E E M E K • Q K V A K V M L E N Y K N I I  
 I R • F • K K W R N D R R • R K • C W R I T R T • F

3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050  
 | | | | | | |  
 15 TTTAGCACACAACAAAAAGATGAAAAAGATTTTGACCAAATTGCGAGCGATAGAGAAAAAGAAGAAATTCAAAAATTA  
F S T Q Q K D E K D F D Q I A S D R E K E E I Q K L  
 L A H N K K M K K I L T K L R A I E K K K K F K N Y  
 20 • H T T K R • K R F • P N C E R • R K R R N S K I T

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130  
 | | | | | | |  
 CTTAATATAGGACATGAAGAGGATGAAGATGTATTAAAAATGGATAGAACAGAGGATAGTATGAGTGATGGAGTTAAT  
 25 L N I G H E E D E D V L K M D R T E D S M S D G V N  
 L I • D M K R M K M Y • K W I E Q R I V • V M E L I  
 • Y R T • R G • R C I K N G • N R G • Y E • W S •

4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210  
 | | | | | | |  
 30 AGTCATTTGTATTATAATAATCTATCAAGTGAAGAAAAAATGGAACAATATAATAATAGAGATGCTTCTAAAGATAGA  
S H L Y Y N N L S S E E K M E Q Y N N R D A S K D R  
 V I C I I I I Y Q V K K K W N N I I I E M L L K I E  
 35 S F V L • • S I K • R K N G T I • • • R C F • R • R

76

4220      4230      4240      4250      4260      4270      4280      4290  
 |           |           |           |           |           |           |  
 GAAGAAATATTGAATAGGTCAAACACAAATACATGTTCTAATGAACATTCATTAAAATATTGTCAATATATGGAAAGA  
E E I L N R S N T N T C S N E H S L K Y C Q Y M E R  
 5    K K Y • I G Q T Q I H V L M N I H • N I V N I W K E  
      R N I E • V K H K Y M F • • T F I K I L S I Y G K K

4300      4310      4320      4330      4340      4350      4360  
 |           |           |           |           |           |           |  
 10    AATAAGGATTTATTAGAAACATGTTCTGAAGACAAAAGGTTACATTTATGTTGTGAAATATCAGATTATTGTTTAAAA  
N K D L L E T C S E D K R L H L C C E I S D Y C L K  
      I R I Y • K H V L K T K G Y I Y V V K Y Q I I V • N  
      • G F I R N M F • R Q K V T F M L • N I R L L F K I

4370      4380      4390      4400      4410      4420      4430      4440  
 |           |           |           |           |           |           |  
 15    TTTTCAATCCTAAATCGATAGAATACTTTGATTGTACACAAAAGAATTGATGACCCTACATATAATTGTTTAGA  
F F N P K S I E Y F D C T Q K E F D D P T Y N C F R  
      F S I L N R • N T L I V H K K N L M T L H I I V L E  
 20    F Q S • I D R I L • L Y T K R I • • P Y I • L F • K

4450      4460      4470      4480      4490      4500      4510      4520  
 |           |           |           |           |           |           |  
 25    AAACAAAGATTTACAAGTATGTCATGTTATAAAATTAAAAACAATATACATTAATATGTTAATAAAAAAATAATATA  
K Q R F T S M S C Y K I K N N I H • Y V N K K N N I  
      N K D L Q V C H V I K L K T I Y I N M L I K K I I Y  
      T K I Y K Y V M L • N • K Q Y T L I C • • K K • Y I

4530      4540      4550      4560      4570      4580      4590      4600  
 |           |           |           |           |           |           |  
 30    TTTTTTCTCTTTTCTTTTTTTTAAATAGGTATGCATTATATTGCCGGGGTGGTATAATAGCCCTTTTATTGTTTA  
F F S L F L F F • • V C I I L P G V V • • P F Y C L  
      F F L F F F F F N R Y A L Y C R G W Y N S P F I V Y  
      F F S F S F F L I G M H Y I A G G G I I A L L L F I

35

77

4610      4620      4630      4640      4650      4660      4670      4680  
 |           |           |           |           |           |           |  
 TTTTAGGTTTCAGCCAGCTATAGGAAGAATTTGTAAGAAAAAAGGATGAAGAAATATAAACAAAAATATAAATATATG  
 F • V Q P A I G R I C K K K R M K K Y K Q K Y K Y M  
 5    F R F S Q L • E E F V R K K G • R N I N K N I N I C  
     L G S A S Y R K N L • E K K D E E I • T K I • I Y A

4690      4700      4710      4720      4730      4740      4750  
 |           |           |           |           |           |           |  
 10   CATATATATTTAAGTATTATAAGAACATATATATAAATAAATATGTATATTTTTATTATTATTATAGGGATGATGA  
     H I Y L S I I R T Y I • I N M Y I F I L L L • G • •  
     I Y I • V L • E H I Y K • I C I F L F Y Y Y R D D E  
     Y I F K Y Y K N I Y I N K Y V Y F Y F I I I G M M K

4760      4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830  
 |           |           |           |           |           |           |  
 15   AAAAGGATTCTACGATTCTAATTTAAATGATTCTGCTTTTGAATATAATAATAATAAATATAATAAATTACCTTATAT  
     K R I L R F • F K • F C F • I • • • • I • • I T L Y  
     K G F Y D S N L N D S A F E Y N N N K Y N K L P Y M  
 20   K D S T I L I • M I L L L N I I I I N I I N Y L I C

4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900      4910  
 |           |           |           |           |           |           |  
 25   GT GTAAGGAAAAAACTAAAAAACAAAAAATATATATATATATATATATATTTACGGATGCATTTCCACA  
     V • G K N • K T K K K K N I Y I Y I Y I Y G C I S T  
     C K E K T K K Q K K K K I Y I Y I Y I F T D A F P H  
     V R K K L K N K K K K Y I Y I Y I Y L R M H F H I

4920      4930      4940      4950      4960      4970      4980      4990  
 |           |           |           |           |           |           |  
 30   TTCCTATTATTTCTTATTCTTATAATTTTTATTATTTATTTATTTATTTTTTTTTTTTCGTAG TTGATCAACAAATAAA  
     F L L F L I L I I F I I Y L F I F F F R S • S T N K  
     S Y Y F L F L • F L L F I Y L F F F F V V D Q Q I N  
     P I I S Y S Y N F Y Y L F I Y F F F S • L I N K • M  
 35

78

5000 5010 5020 5030 5040 5050

| | | | | |

TGTAGTAAATTCTGATTTATATTCGGAGGGTATTTATGATGACACAACGACATTTTAA

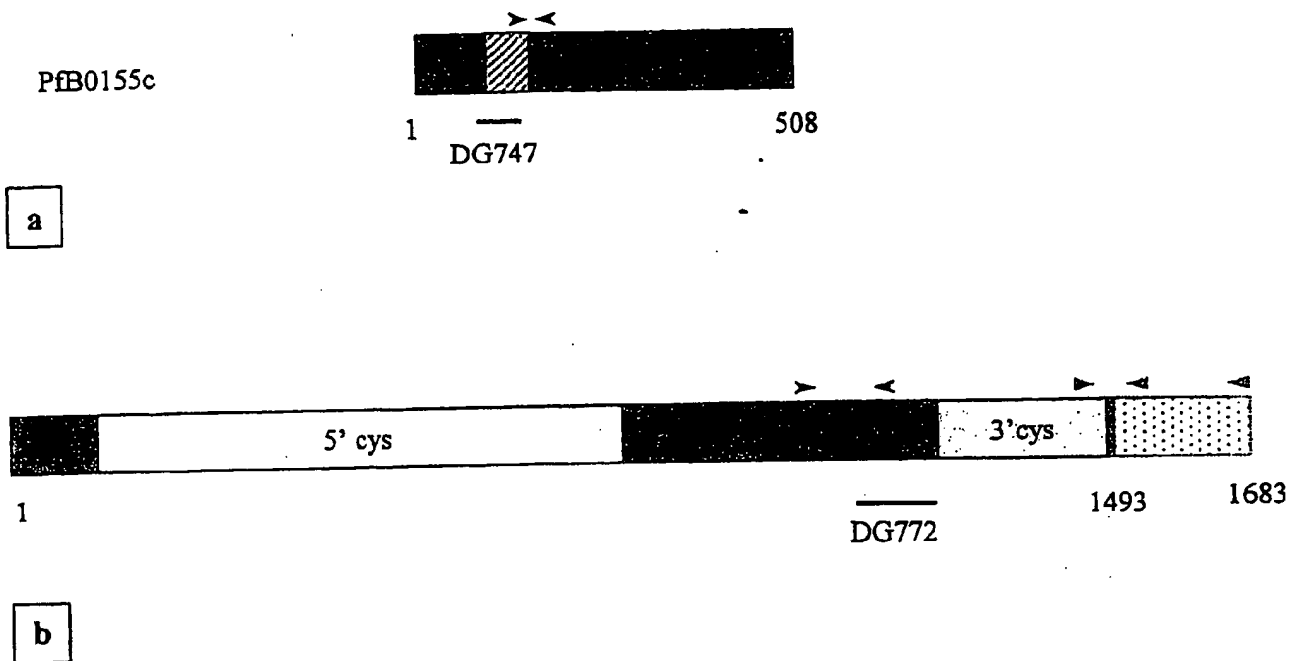
C S K F . F I F G G Y L . .

5 V V N S D L Y S E G I Y D D T T T F .

. . I L I Y I R R V F M M



79

**Figure 3.1**

Représentation schématique des protéines correspondantes aux DG747 (a) et DG772 (b).

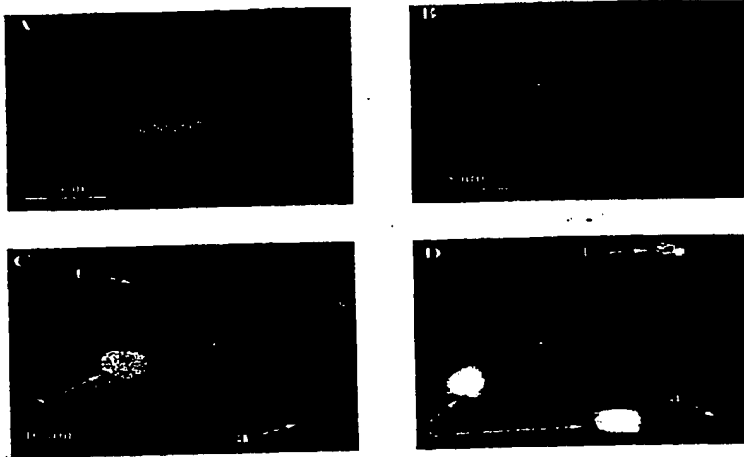
Les flèches noires indiquent la localisation des amorces utilisées pour l'étude de la conservation des fragments

Les flèches rouges indiquent les amorces utilisées dans la réaction RT-PCR.

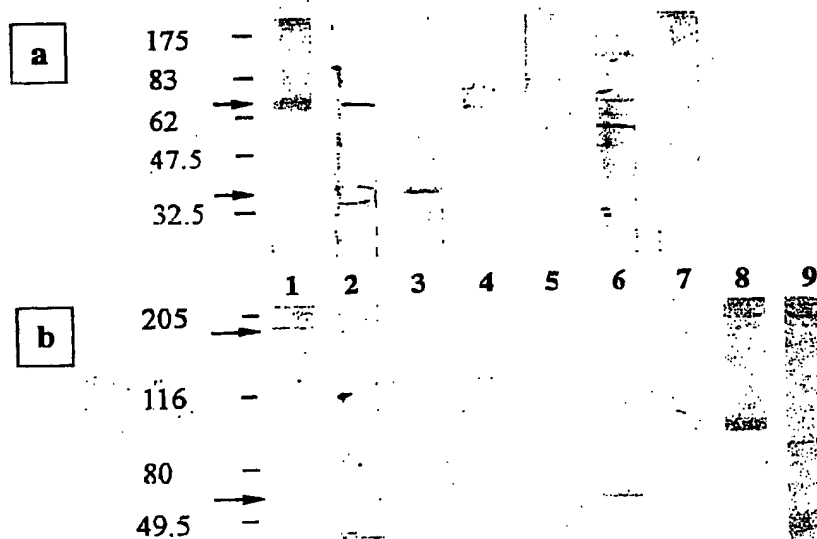
a: la partie hachurée indique la région répétitive.

b: les deux régions consensus 5' cys et 3' cys sont indiquées sur le gène.

La partie en pointillés représente les régions transmembranaires et non-transcrites supposées.

**Figure 3.2**

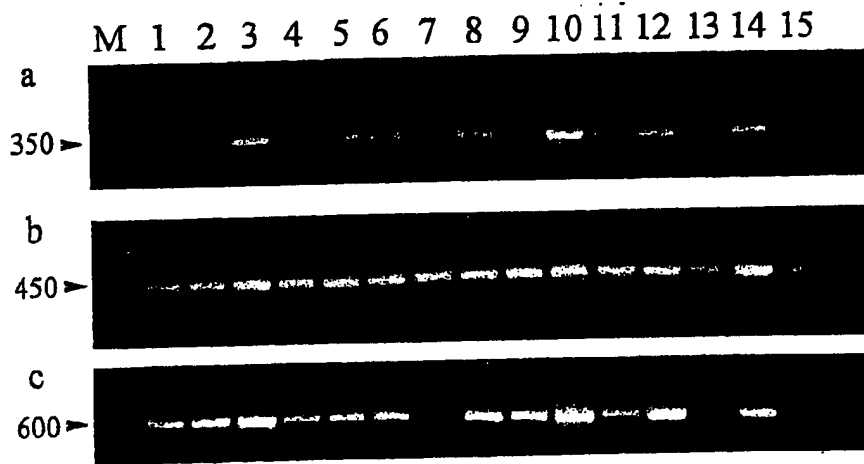
IFATs des stades sporozoïtes et sanguins de *P. falciparum* et des sporozoïtes de *P. yoelii* avec les anticorps anti-747 ou anti-772  
 A, B: sporozoïte de *P. falciparum* (A) ou *P. yoelii* (B) marqué au anti-747 ou anti-772; C, D: stade sanguin asynchrone marqué au anti-747 (C) ou au anti-772 (D), a, t, s: formes anneaux, trophozoïtes ou schizontes, respectivement.

**Figure 3.3**

Western blots de *P. falciparum*, *P. yoelii* et *P. berghei* utilisant des anticorps anti His<sub>6</sub>-747(a) et anti His<sub>6</sub>-772 (b).

1: *P. falciparum* sporozoïtes; 2: *P. falciparum* stade sanguin formes anneaux; 3: *P. falciparum* stade sanguin formes schizontes; 4: surnageant de culture asynchrone; 5: Globules rouges humains; 6: *P. yoelii* sporozoïtes; 7: *P. yoelii* stade sanguin; 8: *P. berghei* stade sanguin; 9: Globules rouges de souris

81

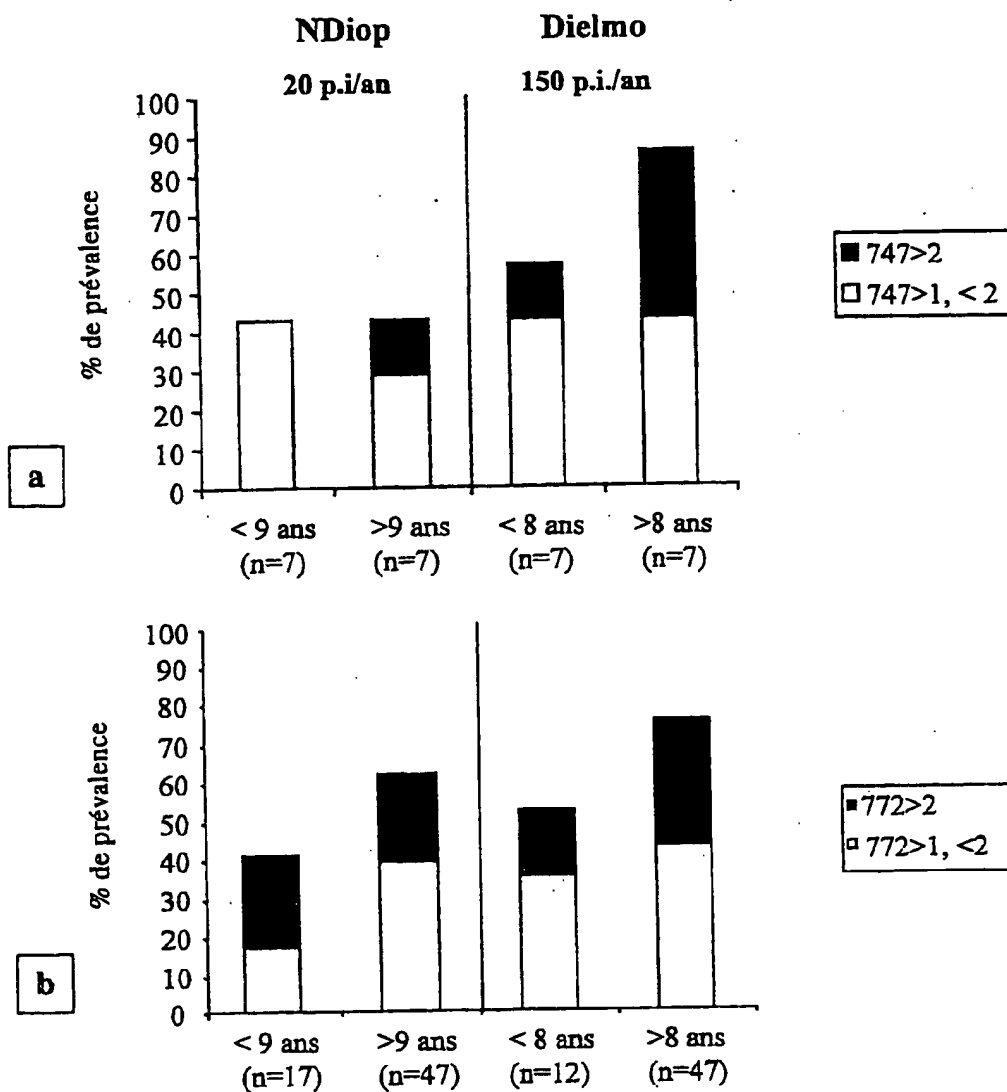
**Figure 3.4**

PCR d'ADN de 12 souches différentes avec des amorces spécifiques de DG747 (a) et DG772 (b). Le contrôle est un gène constitutif, le PCNA (c) [Kilbey, 1993 #519]

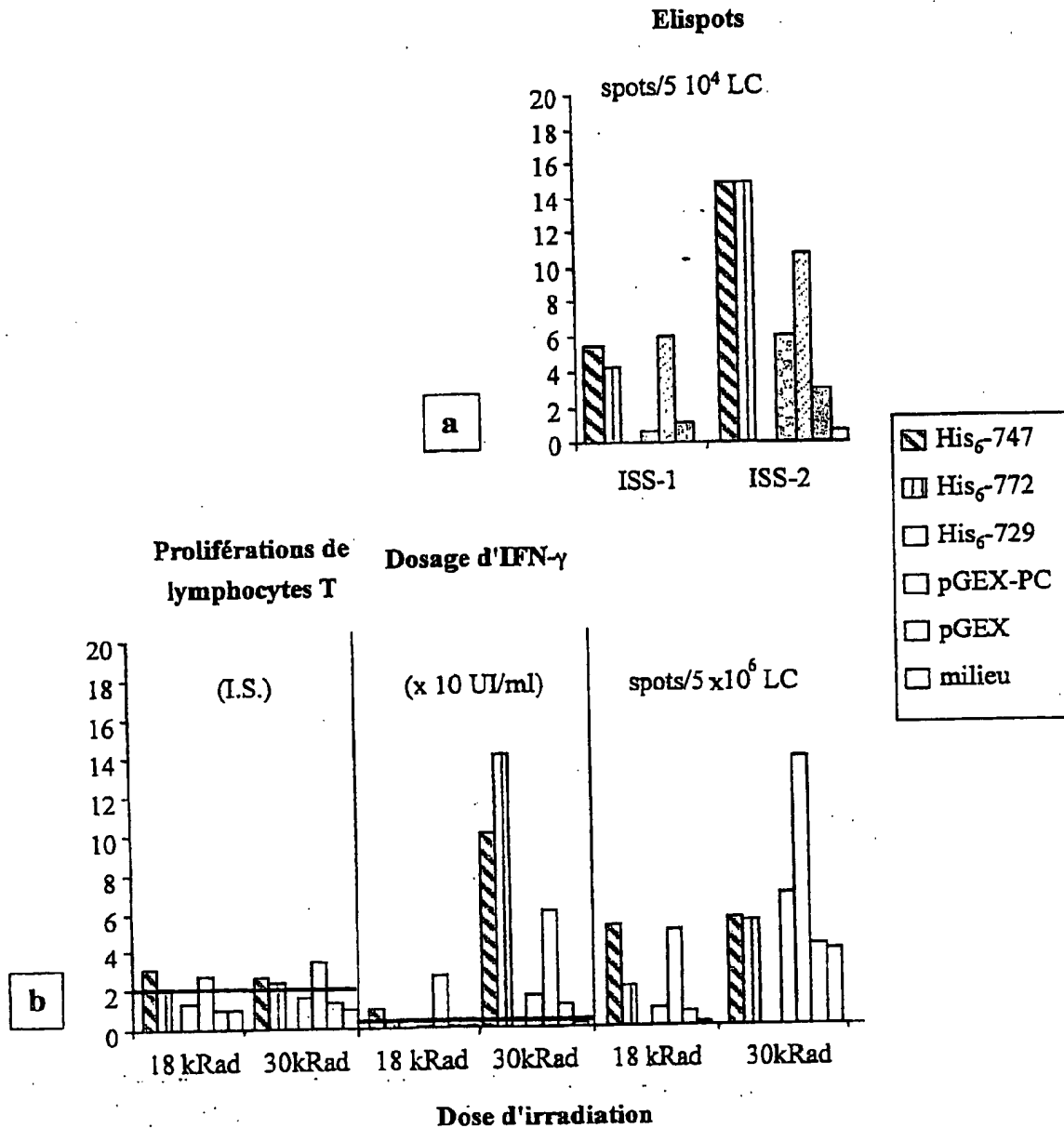
Les ADN utilisés sont issus des souches (puits 1 à 14, de gauche à droite) :

NF54, B1, F32, D7, D25, D28, D41, D50, D51, H1, L1, Mad20, T9.96, PA. Le puit 15 ne contient pas d'ADN. La taille du produit PCR, correspondant à celle attendue est indiquée à côté des flèches.

82

**Figure 3.5**

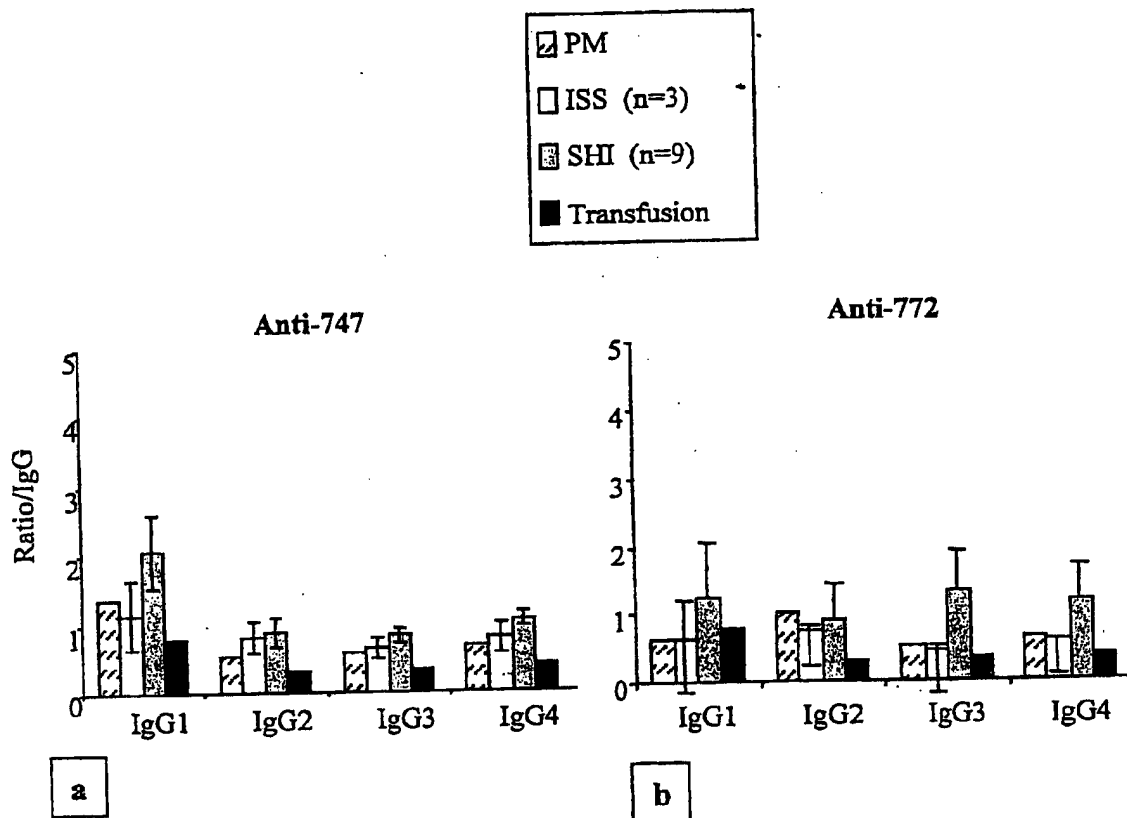
Prévalence des réponses humorales contre His<sub>6</sub>-747 (a) et His<sub>6</sub>-772 (b) dans deux groupes d'âge et dans deux zones d'endémie différentes

**Figure 3.6**

Réponses cellulaires contre His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 chez des humains et des chimpanzés immunisés avec des sporozoïtes irradiés. Pour une récapitulation des réponses contre tous les antigènes voir chapitre 4, figure 4.5.

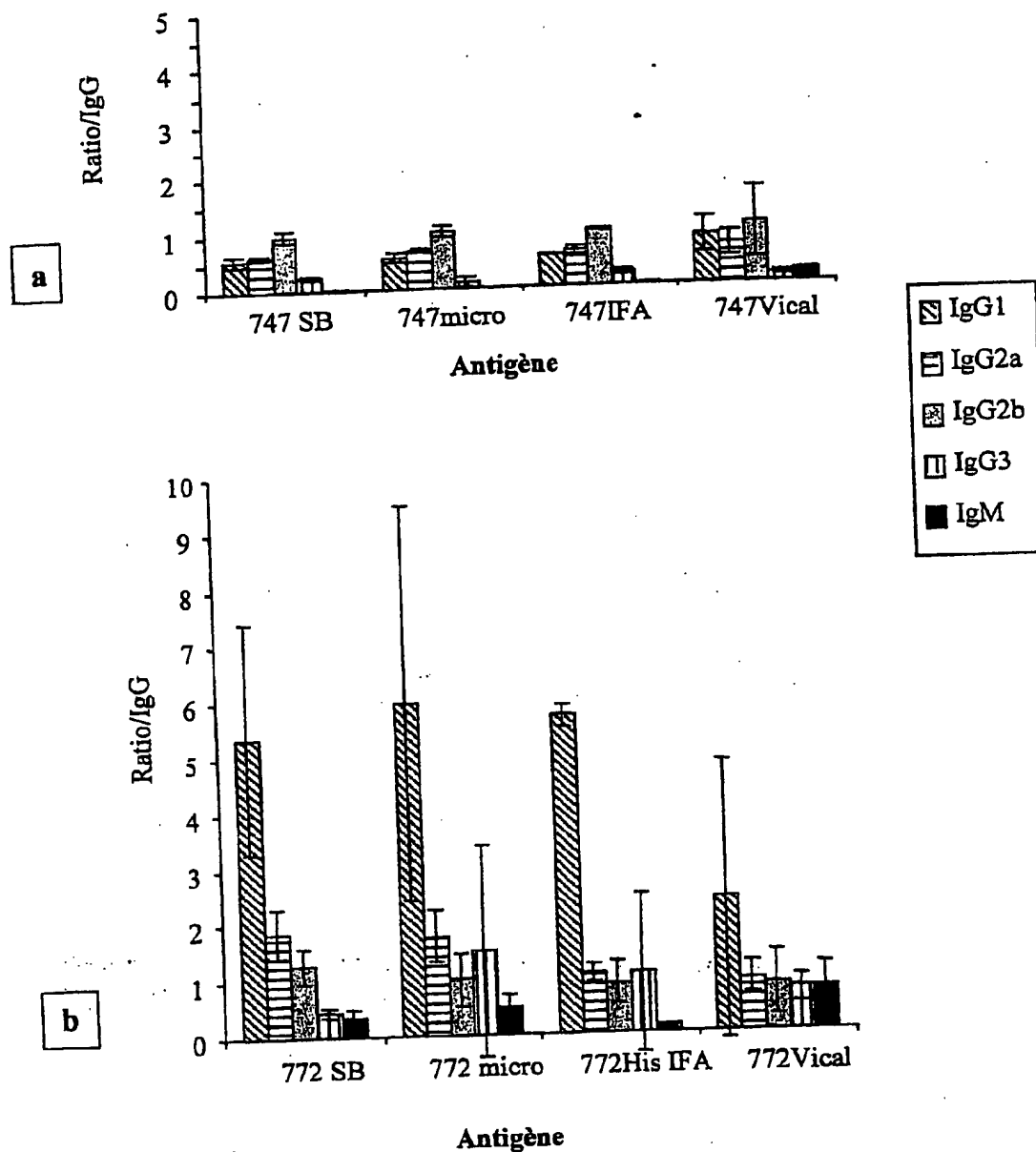
a : Détection par Elispot de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  de cellules provenant d'humains immunisés par des sporozoïtes irradiés; b : réponses cellulaires des chimpanzés immunisés par des sporozoïtes irradiés, détectés par stimulation de prolifération de lymphocytes T et sécrétion d'IFN- $\gamma$  (par dosage et Elispots).

I.S. Index de stimulation; UI : Unités Internationales ; LC Leucocytes (cellules mononuclées du sang périphérique). His<sub>6</sub>-729, PC-pGEX : Recombinants appartenant à la protéine LSA3 ; pGEX : protéine GST. Les valeurs seuils sont indiquées par une droite horizontale sur le graphe.



**Figure 3.7**  
Distribution des isotypes d'IgG dans les réponses humérales contre His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 d'individus exposés différemment au paludisme. ISS : Volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés ; SHI : Sérum hyper-immun ; Transfusion : Sérum de personnes ayant contracté un paludisme par transfusion de sang infecté. Les taux de réponses détectés en ELISA sont représentés par rapport aux taux d'IgG total obtenus. L'écart type est indiqué sur le graphe.

85

**Figure 3.8**

Réponses humorales de souris immunisées avec quatre formulations de la protéine recombinante. a: réponses anti-747; b: réponses anti-772. SB: avec l'adjuvant SBS2A ; micro: recombinant adsorbé sur des microparticules ; IFA : Adjuvant incomplet de Freund ; Vi: Sous forme d'ADN dans le vecteur VR1020 en PBS .